



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**OVĚŘENÍ VÝTĚŽNOSTI METODY STANOVENÍ
MASTNÝCH KYSELIN**

RECOVERY OF THE METHOD FOR ASSESSMENT OF FATTY ACIDS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Michal Gross

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1441/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Michal Gross**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Ověření výtěžnosti metody stanovení mastných kyselin

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - mastné kyseliny – charakteristika, rozdělení
 - přehled metod vhodných pro stanovení mastných kyselin (izolace z matrice vzorku, derivatizace, stanovení)
 - plynová chromatografie s plameno–ionizační detekcí (GC–FID) – princip, popis, instrumentace
 - validace analytických metod
2. Ověřte výtěžnost metody stanovení mastných kyselin aplikací na vybrané vzorky

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Michal Gross
student(ka)

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předmětem této bakalářské práce je ověření výtěžnosti metody stanovení mastných kyselin pomocí plynové chromatografie s plamenově-ionizační detekcí.

V teoretické části práce jsou charakterizovány mastné kyseliny a lipidy, možnosti extrakce lipidických frakcí ze vzorku potravin a následné úpravy extraktu, dále je stručně popsán princip a běžná instrumentace kapilární plynové chromatografie s plamenově-ionizační detekcí a jsou uvedeny základní parametry pro validaci analytických metod.

V experimentální části bylo provedeno ověření výtěžnosti vhodné metody stanovení mastných kyselin, tj. extrakce lipidů ze vzorku dle normy ČSN EN ISO 1735 s následnou transesterifikací volných i vázaných mastných kyselin katalyzovanou fluoridem boritým dle normy ČSN EN ISO 12966-2 na jejich methylestery, které lze účinně stanovit použitím plynového chromatografu s plamenově-ionizačním detektorem.

Jako vzorky byly použity řepkový olej a polotvrdý sýr tylžského typu zakoupené v běžné obchodní síti.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mastné kyseliny, extrakce lipidů, plynová chromatografie s plamenově-ionizační detekcí, výtěžnost, oleje, sýry.

ABSTRACT

The objective of this bachelor thesis is to verify recovery yield used for determination of fatty acids based on gas chromatography with flame-ionization detection.

In the theoretical part, fatty acids and lipids are characterized and extraction of lipidic fraction from food samples with its subsequent adjustments is suggested. Furthermore, the principle and current instrumentation of capillary gas chromatography with flame-ionization detection and standard parameters for validation of the analytical method are specified.

In the experimental part, verification of recovery yield of the method for assessment of fatty acids was performed. The used method includes extraction of lipids from a sample in accordance with the standard ISO 1735 regulation and transesterification of both free and bounded fatty acids catalysed by boron trifluoride according to the ISO 12966-2 standard regulation. The produced methyl esters can be effectively determined using gas chromatography with flame-ionization detector.

Analysed samples of rapeseed oil and tilsiter-type cheese were purchased in a common food market.

KEY WORDS

Fatty acids, lipid extraction, gas chromatography with flame-ionization detection, recovery, oils, cheese.

GROSS, M. *Ověření výtěžnosti metody stanovení mastných kyselin* [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-27]. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/116523>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že jsem všechny použité zdroje správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Evě Vítové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, neutuchající ochotu a čas, který mi věnovala po celou dobu řešení této práce. Velký dík patří také mé rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Mastné kyseliny	10
2.1.1	Charakteristika	10
2.1.2	Rozdělení mastných kyselin	15
2.2	Metody vhodné pro stanovení mastných kyselin	16
2.2.1	Izolace lipidů z matrice vzorku	16
2.2.2	Derivatizace mastných kyselin	18
2.2.3	Stanovení methylesterů mastných kyselin	20
2.3	Plynová chromatografie s plamenově-ionizační detekcí	20
2.3.1	Popis a princip	20
2.3.2	Instrumentace	22
2.4	Validace analytických metod	25
2.4.1	Výtěžnost	25
2.4.2	Opakovatelnost	25
2.4.3	Reprodukovatelnost	25
2.4.4	Mez detekce	25
2.4.5	Mez stanovitelnosti	25
2.4.6	Pracovní rozsah	26
2.4.7	Linearita	26
2.4.8	Nejistota	26
2.4.9	Robustnost	26
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1	Použité laboratorní vybavení a chemikálie	27
3.1.1	Přístroje	27
3.1.2	Pracovní pomůcky	27
3.1.3	Plyny	27
3.1.4	Chemikálie	27
3.2	Analyzované vzorky	28
3.3	Použité metody a postupy	28
3.3.1	Extrakce dle ČSN EN ISO 1735	28

3.3.2	Příprava standardu mastných kyselin	29
3.3.3	Příprava methanolického roztoku hydroxidu sodného	29
3.3.4	Příprava methylesterů mastných kyselin	29
3.3.5	Podmínky stanovení methylesterů mastných kyselin.....	30
3.3.6	Výpočet obsahu mastných kyselin ve vzorku	31
3.3.7	Statistické zpracování výsledků	32
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	33
4.1	Extrakce lipidů	33
4.2	Esterifikace mastných kyselin	33
4.3	Stanovení methylesterů mastných kyselin	34
4.4	Výtěžnost stanovení	34
5	ZÁVĚR	37
	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	38
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	41
	SEZNAM PŘÍLOH	42

1 ÚVOD

Tuk platí za jednu z neodmyslitelných složek většiny potravin. Často i velmi nízké množství tuku v potravíně může být určující pro její senzorické vlastnosti, vůni, chuť, ale i texturu.

U nemalého množství výrobků se proto vyplatí znát jejich obsah tuku, výhodným ukazatelem je také spektrum mastných kyselin, které jej tvoří a podle kterého se dá např. usuzovat na autenticitu výrobku. Typickým příkladem jsou rostlinné oleje a tuky – složení spekter mastných kyselin olivového, slunečnicového, řepkového, lněného, kokosového, palmového a palmojádrového oleje jsou navzájem tak odlišná, že je pomocí nich většinou možné oleje identifikovat, stejně jako poukázat na možné falšování, tedy přimíchávání levných olejů do dražších (v nedávné době byly odhaleny případy falšování extra-panenského olivového oleje dováženého z Itálie).

Zastoupení jednotlivých mastných kyselin je také cenným parametrem při monitoringu kvality některých mléčných výrobků, zejména zrajících sýrů. Zrání sýrů je komplexní proces vedoucí k výrobku vynikajících vlastností, jakákoli analytická kontrola kvality ve spojení s empirickou může přispět k úspěšnému zvládnutí celého procesu zrání.

Tato bakalářská práce se jako součást skupiny závěrečných prací věnovaných stanovení mastných kyselin v potravinách, především v různých typech sýrů a jim podobných výrobků, věnuje otázce výtěžnosti optimalizované metody.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mastné kyseliny

2.1.1 Charakteristika

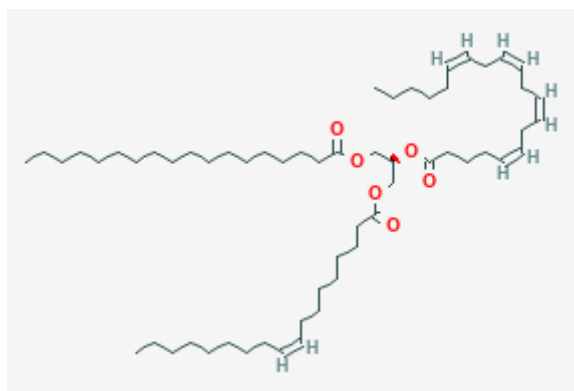
Přirozeně se vyskytující mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny s nerozvětveným uhlovodíkovým řetězcem dlouhým od 3 do 24 uhlíků (rozvětvené mastné kyseliny tvoří jen bakterie). Neesterifikované mastné kyseliny se označují jako volné mastné kyseliny, pro něž je typická výrazně amfipatická povaha a velmi nízké zastoupení v živých systémech. V tukách a lipidech membrán jsou mastné kyseliny esterifikovány alkoholy (glycerolem, sfingosinem nebo cholesterolem). [1]

Tuky jsou estery trojsytného alkoholu glycerolu se třemi mastnými kyselinami. Každý ze tří acylových zbytků na jedné molekule tuku může mít různou délku i různý počet dvojných vazeb, což poskytuje ohromné množství možných kombinací (příklad ukazuje Obrázek 1). Pokud se tuky izolují z biologického materiálu, získá se vždy směs velmi podobných sloučenin, které se liší svými zbytky mastných kyselin. Tuky ve stravě obsahují především kyselinu palmitovou, stearovou, olejovou a linolovou. Nenasycené mastné kyseliny se nejčastěji váží na prostřední atom uhlíku v molekule glycerolu. [1,2]

Délka zbytků mastných kyselin a počet dvojných vazeb určují bod tání tuku. Ten je tím nižší, čím kratší jsou řetězce a čím více obsahují dvojných vazeb (dobře patrné z Tabulky 1 na výběru běžně se vyskytujících mastných kyselin). Tuky, které jsou kapalné za pokojové teploty, se označují jako oleje, např. olivový, řepkový, slunečnicový aj. [1]

Tabulka 1: Přehled vybraných mastných kyselin [3]

Název mastné kyseliny		Vzorec		Teplota tání [°C]
systematický	triviální	sumární	triviální	
butanová	máselná	C ₄ H ₈ O ₂	4:0	-7,9
hexanová	kapronová	C ₆ H ₁₂ O ₂	6:0	-3,4
oktanová	kaprinová	C ₈ H ₁₆ O ₂	8:0	16,7
dekanová	kaprylová	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	10:0	31,6
dodekanová	laurová	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	12:0	44,2
tetradekanová	myristová	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	14:0	54,1
hexadekanová	palmitová	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	16:0	62,7
oktadekanová	stearová	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	18:0	69,6
cis-oktadec-9-enová	olejová	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	18:1Δ9	10,5
(cis,cis)-oktadeka-9,12-dienová	linolová	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	18:2Δ9,12	-5,0
(cis,cis,cis)-oktadeka-9,12,15-trienová	linolenová	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	18:3Δ9,12,15	-11,0

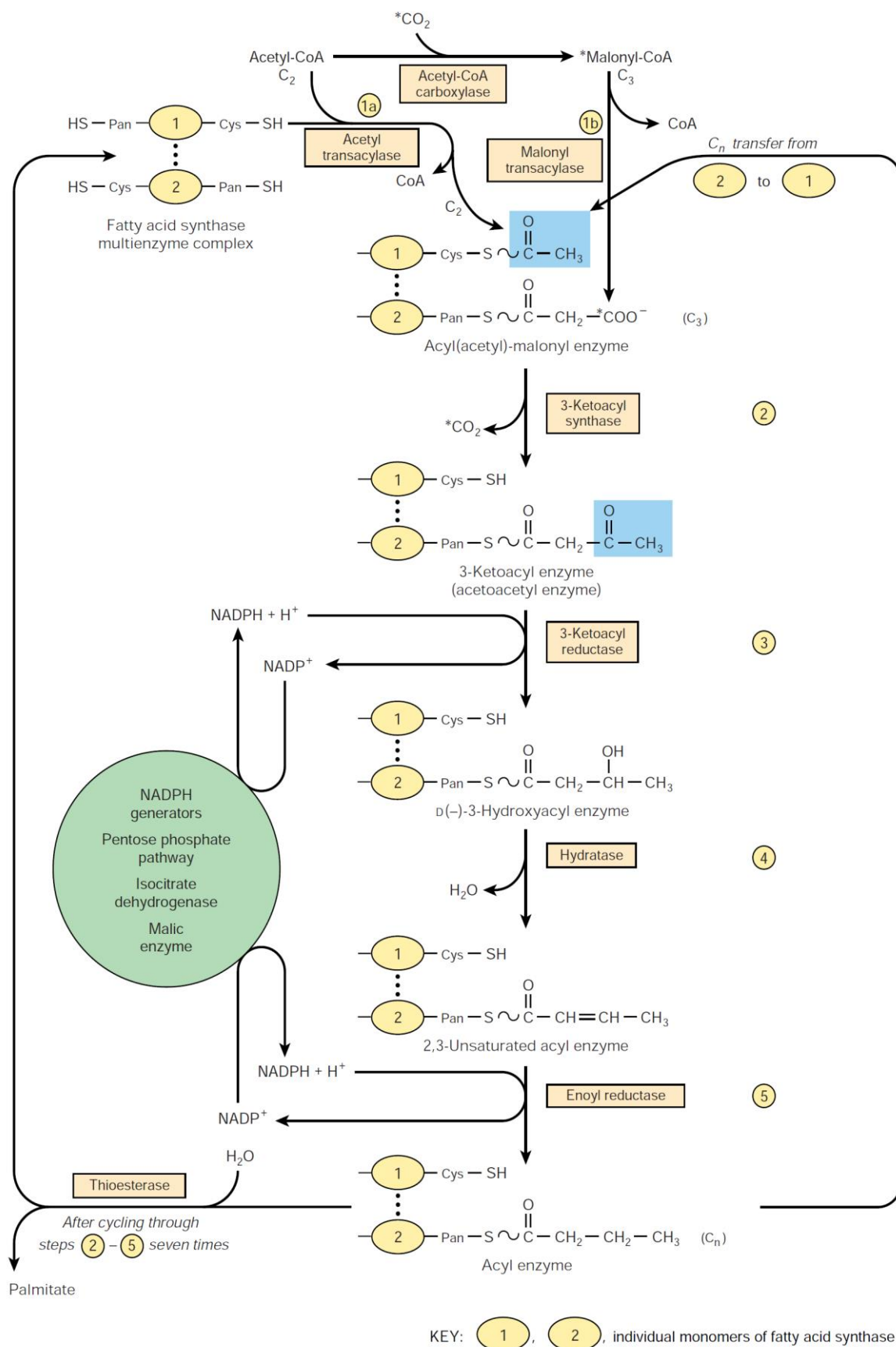


Obrázek 1: Triacylglycerol [32]

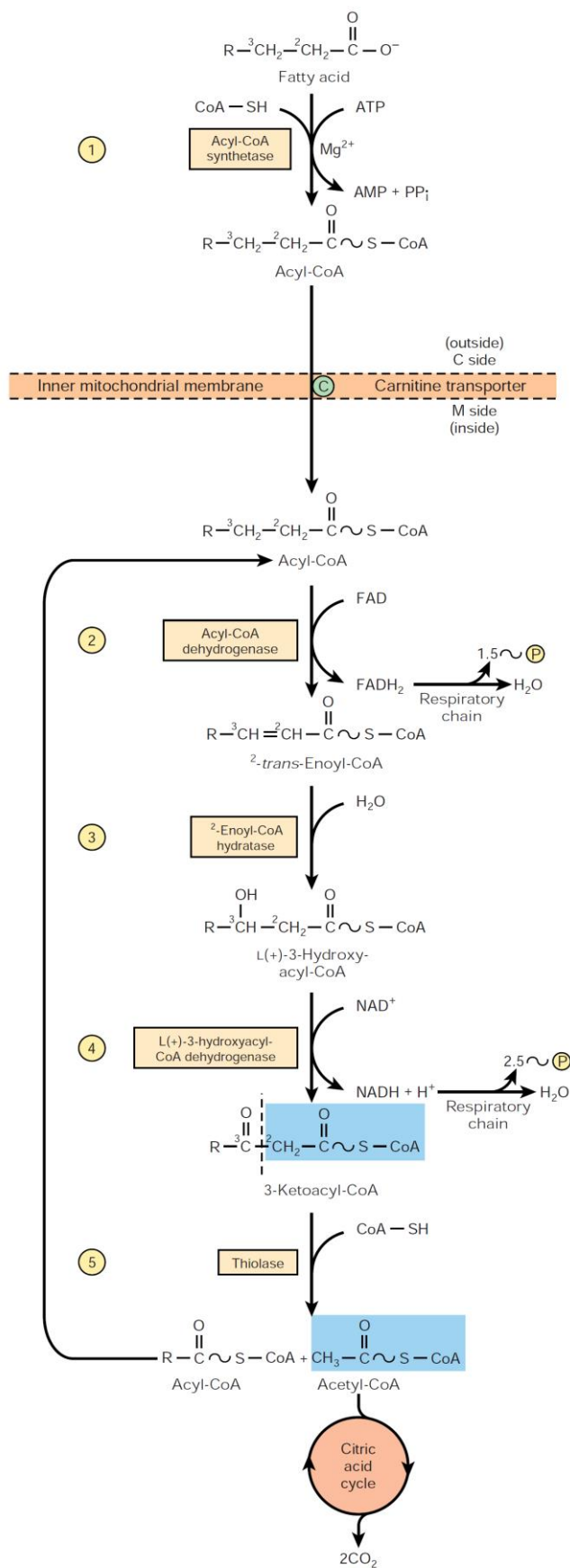
2.1.1.1 Metabolické reakce mastných kyselin

Reakce mastných kyselin hrají významnou roli nejen v metabolismu živých organismů, člověka samozřejmě nevyjímaje, ale také v technologii potravin, kde mohou sloužit jako látky nesoucí informaci o změnách potravin, stejně jako mohou ovlivňovat senzorickou kvalitu produktu. Následující část uvádí základní uplatňované metabolické procesy a dráhy.

- *Aktivace mastných kyselin* koenzymem A na acyl-CoA je nezbytná k odbourání nebo přeměně mastných kyselin na jiné sloučeniny.
- *Biosyntéza mastných kyselin* probíhající v cytoplazmě s acetyl-CoA coby výchozím materiálem a redukčním činidlem NADPH, který vzniká převážně v pentózovém cyklu. Potřebný acetyl-CoA se získává v citrátovém cyklu a exportuje se z mitochondrie. Dráhu ukazuje Obrázek 2.
- *Prodlužování mastných kyselin* se děje na hladkém endoplazmatickém retikulu v případech, kdy jsou vyžadovány mastné kyseliny s více než C₁₆-řetězcem, které ještě lze syntetizovat v cytoplazmě. Jsou nutné např. pro činnost mozku.
- *Desaturace mastných kyselin* slouží k přeměnám nasycených mastných kyselin v nenasycené. Činnost desaturáz je omezená, dvojné vazby mohou tímto způsobem vznikat jen do C-9. Nejdůležitějším produktem je olejová kyselina.
- *Lipogeneze* je fixována na endoplazmatické retikulum a definuje se jako syntéza triacylglycerolů z acyl-CoA a glycerol-3-fosfátu postupným připojováním acylových zbytků.
- *β -oxidace*, neboli odbourávání mastných kyselin, probíhá v mitochondriální matrix. Vzniká při ní acetyl-CoA a redukované koenzymy NADH a QH₂, které se zužitkují pro tvorbu ATP v dýchacím řetězci. Transport acyl-CoA do mitochondrie zajišťuje karnitinový článek. Sled reakcí je znázorněn na Obrázku 3.
- *Lipolýza*, odbourávání tuků, probíhá činností lipáz, které uvolňují acylové zbytky jako volné anionty mastných kyselin. Tato hydrolýza na mastné kyseliny, glycerol, monoglyceridy a diglyceridy je považována za nezbytnou např. v procesu vývoje senzorických vlastností sýrů. [1,4]



Obrázek 2: Biosyntéza mastných kyselin [33]



Obrázek 3: β -oxidace mastných kyselin [33]

2.1.1.2 Chemické reakce mastných kyselin

Kromě metabolických pochodů probíhajících v živých organismech, podléhají mastné kyseliny a tuky i mnoha dalším typům organicko-chemických reakcí, při nichž se uplatňuje karboxylová skupina i uhlovodíkový zbytek molekuly, především obsahuje-li dvojné vazby. Dále jsou uvedeny příklady takovýchto reakcí. [5]

- *Tvorba solí* s kationty kovů nebo organických zásad probíhá poměrně ochotně, nejnázve s alkalickými kovy (vznik mýdel) a amoniakem.
- *Esterifikace* patří mezi hlavní reakce mastných kyselin, při níž karboxylová kyselina reagující s alkoholem poskytuje ester. Pro estery a pro přírodní tuky jsou charakteristické interesterifikační reakce katalyzované acidobazickými katalyzátory nebo enzymy. Výměna acylových zbytků reakcí karboxylové kyseliny s triacylglycerolem se nazývá *acidolýza*, v praxi má jen velmi omezený význam. Při *alkoholýze* dochází k reakci triacylglycerolu s alkoholem, která dává vzniknout esterům mastných kyselin (MK) za odlučování glycerolu. Tato reakce má významnou roli, zakládá se na ní výroba bionafty sestávající z methylesterů rostlinných olejů. Speciálním případem alkoholýzy je *glycerolýza*, při níž triacylglyceroly reagují s přebytkem glycerolu za vzniku monoacylglycerolů, které se používají jako potravinářské a kosmetické emulgátory. *Transesterifikace*, neboli esterová výměna, je reakcí různých triacylglycerolů, které si za bazické katalýzy nahodile vyměňují acylové zbytky. Nejvýznamnější praktickou aplikací této reakce je výroba ztužených tuků, k níž se touto metodou přistoupilo v momentu, kdy se ukázalo jako nežádoucí produkovat ztužené tuky s *trans*-isomery metodou katalytické hydrogenace.
- *Izomerační reakce* jsou myslitelné u nenasycených mastných kyselin, kdy může jít o změnu jejich sterické konfigurace (*cis-trans*) nebo o posun dvojné vazby.
- *Cyklizace* a *polymerace* jsou poměrně málo často probíhající reakce, například oleje s podílem (extrémním zahřevem) polymerizovaných mastných kyselin se nedoporučují k potravinářskému použití.
- *Hydrogenace nenasycených mastných kyselin*, označovaná v praxi jako ztužování tuků, spočívá v syčení dvojných vazeb vodíkem, což nevyhnutelně mění povahu tuku. Kvůli částečné (ale nezanedbatelné) produkci *trans*-isomerů je však tato metoda nevhodná pro potravinářství vzhledem k jejich negativnímu působení na lidský organismus.
- *Oxidace* jsou reakce uhlovodíkového řetězce společné volným mastným kyselinám a jejich esterům. Nejběžnějším typem oxidace je *autooxidace*, probíhající radikálovým mechanismem. Při běžných teplotách dochází k oxidaci nenasycených mastných kyselin vzdušným kyslíkem, při vysokých teplotách i nasycených. V praxi je běžná při prakticky jakémkoli zpracovávání a skladování potravin alespoň v malé míře. Nezanedbatelné je oxidativní žluknutí, jehož produkty ovlivňují senzorickou jakost; při nízké míře vznikají látky charakteristického aroma, což je žádoucí, vysoký obsah produktů žluknutí však způsobuje typické pachutě, snižuje tak senzorickou hodnotu potraviny, nebo ji zcela znehodnocuje.
- *Pyrolytické reakce* patří v praxi mezi nežádoucí reakce tuků probíhající za vysoké teploty, při nichž se uvolňují volné mastné kyseliny a glycerol, který dále v bezvodém prostředí degraduje na v dnešní době hojně diskutovaný, zdraví škodlivý akrolein. [5]

2.1.2 Rozdělení mastných kyselin

Mastné kyseliny lze dělit z několika hledisek. Vzhledem k různému chování v metabolismu se mastné kyseliny rozdělují na mastné kyseliny s krátkým (C3-C6), středně dlouhým (C8-C10), dlouhým (C12-C18) a s velmi dlouhým řetězcem (> C18). [1]

Podobně se dají rozdělit podle stupně nenasycenosti, tedy obsahu dvojných vazeb v acylovém řetězci, na mastné kyseliny nasycené (bez dvojných vazeb), mononenasycené (monoenové, s jednou dvojnou vazbou) a polynenasycené (polyenové, s více dvojnými vazbami). Následující přehled dělí mastné kyseliny tímto způsobem a poukazuje na výskyt nejčastějších zástupců každé skupiny v přírodních vzorcích.

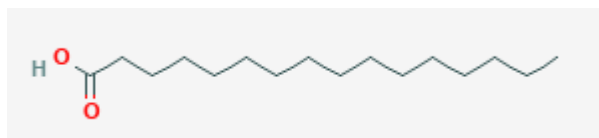
2.1.2.1 Nasycené mastné kyseliny

Mastné kyseliny s kratším řetězcem jsou typické pro mléčné tuky, např. máselná kyselina a skupina kyselin s 6-10 uhlíky v molekule. Máselná kyselina tvoří 4-8 % a kapronová kyselina 1-3 % hmotnosti veškerých mastných kyselin tuku kravského mléka, přičemž v triacylglycerolech jiných tuků přezvýkavců, než je mléčný tuk, se nevyskytují.

Mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem jsou přítomny, obvykle jako minoritní složky, v triacylglycerolech mléčných tuků. Ve většině rostlinných tuků se nenachází, až na výjimky jako tuk palmových semen či kokosový tuk s obvykle vysokým obsahem laurové kyseliny.

Myristová kyselina je běžnou složkou lipidů, na jejichž složení se podílí obvykle 1-2 %, výjimkou je zde mléčný, kokosový a palmojádrový tuk, kde je přítomna ve větším množství (kolem 10 %).

Palmitová kyselina (Obrázek 4) se jako nejrozšířenější nasycená mastná kyselina vyskytuje jak v lipidech živočišných tkání (20-30 %), tak v rostlinných olejích ze semen (5-30 %) a palmovém oleji (> 40 %).

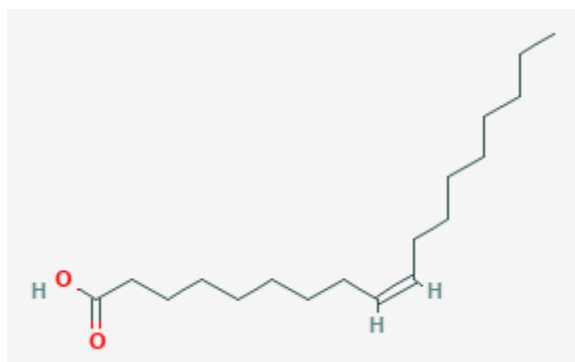


Obrázek 4: Palmitová kyselina [34]

Stearová kyselina je významně zastoupena v mléčném tuku (6-12 %), lojích (5-40 %) a v kakaovém másle (30-36 %), v živých systémech tvoří až 80 % mastných kyselin v gangliosidech. [5]

2.1.2.2 Mononenasycené mastné kyseliny

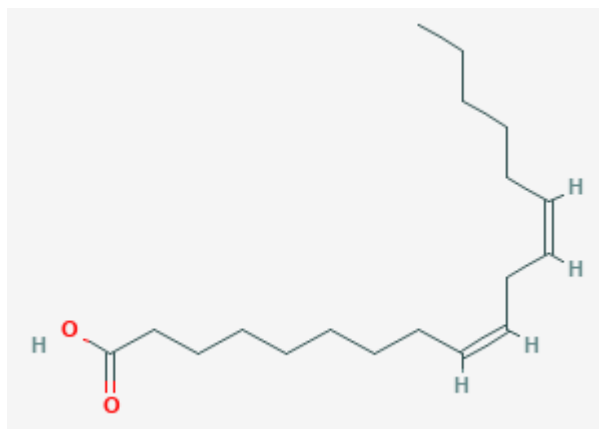
Nejrozšířenější nenasycenou mastnou kyselinou je monoenová olejová kyselina (Obrázek 5), která se alespoň v malém množství nachází prakticky ve všech živočišných a rostlinných lipidech. Tvoří 30-40 % celkových mastných kyselin v tukové tkáni živočichů a 20-80 % v potravinářských olejích. Další monoenové kyseliny, např. kaproolejová a palmitolejová, se vyskytují v mléčném tuku. [5]



Obrázek 5: Olejová kyselina [35]

2.1.2.3 Polynenasycené mastné kyseliny

Z polyenových mastných kyselin je nejběžnější linolová kyselina, přítomná přinejmenším ve stopách ve všech tucích. Např. slunečnicový olej obsahuje 50-60 % linolové kyseliny (Obrázek 6) z celkových mastných kyselin, živočišné tuky pak 15-25 %. α -Linolenová kyselina se vyskytuje ve fotosyntetických pletivech rostlin, zajímavé je její zastoupení v oleji ze semen lnu, který jí obsahuje až 65 %, v ostatních olejích její obsah nepřesahuje 10 %.



Obrázek 6: Linolová kyselina [36]

Speciálním případem jsou oleje mořských ryb, jejichž mastné kyseliny s 20-22 atomy uhlíku obsahují 4-6 dvojných vazeb. [5]

2.2 Metody vhodné pro stanovení mastných kyselin

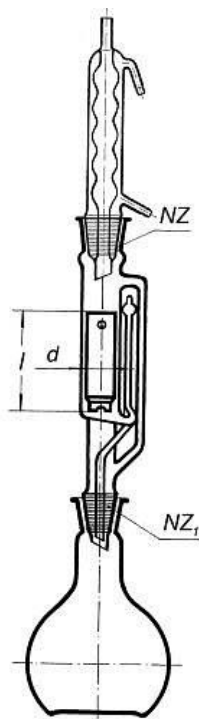
2.2.1 Izolace lipidů z matrice vzorku

Před vlastním stanovením mastných kyselin je nezbytné z matrice potravin izolovat samotnou lipidickou složku. Existuje široká paleta různých metod extrakce ze vzorku, ať už obecné univerzální metody, nebo specifické metody k použití na určitý druh matrice, kde tyto mohou dosáhnout lepších výsledků než metody obecné. Následující text uvádí přehled a krátký popis významných extrakčních metod.

2.2.1.1 *Extrakce podle Soxhleta*

Soxhletova metoda extrakce je jednou z fundamentálních technik celé analytické chemie potravin. Je považována za standard a je vhodná zejména pro materiály s nízkým obsahem vody, např. vzorky olejnin.

Aparaturu tvoří destilační baňka, extrakční nástavec, do nějž se vkládá papírová nebo skleněná extrakční patrona s vhodně upraveným vzorkem, a zpětný chladič (Obrázek 7). Destilační baňka s vybraným rozpouštědlem (obvykle pentan, hexan, příp. petrolether) se zahřívá, páry rozpouštědla stoupají postranní trubicí, kondenzují v chladiči a stékají na vzorek v patroně. Hladina rozpouštědla tak v extraktoru stoupá, než dosáhne k přepadové trubici, čímž odteče celý objem rozpouštědla zpět do destilační baňky díky principu spojených nádob, extrakt se tak shromažďuje v destilační baňce.



Obrázek 7: Soxhletova extrakční aparatura [37]

Za hlavní nevýhodu této metody se považuje její velká časová náročnost, má-li být výsledek uspokojující kvality. Zanedbat nelze ani relativně vysokou spotřebu rozpouštědel. [6-8]

2.2.1.2 *Extrakce podle Grossfelda*

Varianta Soxhletovy metody upravená pro vzorky s vyšším obsahem sacharidů, např. cereálie, pečivo. Před extrakcí se provádí částečná hydrolýza vzorku kyselinou chlorovodíkovou. Jedinou odlišností v extrakci je použití diethyletheru jako rozpouštědla. [8]

2.2.1.3 *Extrakce podle Folche*

Folcheho technika extrakce se taktéž řadí mezi základní a hlavní metody, v dnešní době existuje množství různých úprav, zejména v poměrech a množstvích jednotlivých používaných rozpouštědel. [9,10]

Metoda se zakládá na extrakci směsí rozpouštědel, nejčastěji chloroformu a methanolu, po níž následuje homogenizace a filtrace nebo centrifugace k oddělení nerozpuštěných složek.

Posledním krokem je odpaření rozpouštědla na vakuové rotační odparce při teplotě do 40 °C. [8]

2.2.1.4 Extrakce podle Rösseho a Gottlieba

Tento typ extrakce je nejvhodnější pro stanovení tuku v mléce a mléčných výrobcích, zejména pro vzorky s vyšším obsahem vody, bílkovin a sacharidů, lze ji tak použít pro analýzu např. syrovátky, podmásli, odstředěného mléka, smetany aj. [11]

Ke vzorku mléčné povahy se přidá amoniak, ethanol a diethylether, provede se třepání, následuje přidavek petroletheru, další třepání, ustálení fází, oddělení čiré etherové fáze, z níž se oddestilují rozpouštědla na vakuové odparce a vážkové stanovení tuku. [8]

2.2.1.5 Extrakce kapalinou

Obecná metoda spočívající v zalití vzorku dezintegrovaného na malé částice vhodným rozpouštědlem, jenž se po určité době oddělí filtrací, centrifugací apod. Rychlost extrakce se zvyšuje třepáním nebo mícháním. [6]

2.2.1.6 Extrakce pevnou fází

Extrakce pevnou fází (solid phase extraction, SPE) je v dnešní době jednou z nejvíce používaných a nejvíce výkonných technik rychlé selektivní přípravy vzorků. Princip metody spočívá v adsorpci žádoucích složek vzorku na pevný sorbent, přes nějž vzorek protéká. Výhodou je malé množství použitých rozpouštědel a „obejití“ tvorby emulze při klasické extrakci kapalina-kapalina. V současnosti se nejhojněji používají jednorázové extrakční kolony s různými náplněmi. Celý extrakční proces má v zásadě čtyři části: kondicionace kolony, aplikace vzorku, promývání kolony a eluce analytu z kolony. [12,13]

2.2.1.7 Mikroextrakce pevnou fází

Mikroextrakce pevnou fází (solid phase microextraction, SPME) je výkonná moderní metoda vycházející z SPE, obejde se ovšem bez použití rozpouštědel a dá se pokládat za univerzální.

Křemenné vlákno pokryté zakotveným sorbentem se umístí do prostředí nasyceného těkavými analyty ke stanovení (nad kapalným vzorkem, příp. se do kapaliny ponoří), vlákno se pak nechá termicky desorbovat v zařízení pro další analýzu – nejčastěji v dávkovacím zařízení pro plynovou chromatografii. [12]

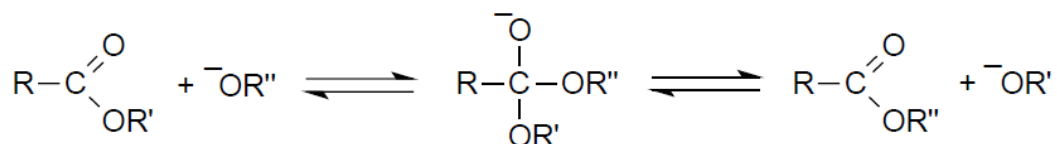
2.2.2 Derivatizace mastných kyselin

Mastné kyseliny se samy od sebe špatně chromatografují (s výjimkou mastných kyselin s krátkými řetězci, např. kyselina butanová nebo pentanová). V praxi je proto lepší před analýzou plynovou chromatografií vytvořit jejich estery (klíčová je neutralizace polární karboxylové skupiny), zpravidla methylestery (MeMK), které mají oproti vyšším esterům jisté výhody, např. nejvyšší těkavost, vysoké výtěžky, poměrně širokou nabídku metod jejich přípravy aj. [14,15]

Nejběžnějším způsobem přípravy MeMK je transesterifikace, resp. transmethylace. Jde o vratnou reakci, k jejímu úspěšnému provedení je proto nutný velký přebytek methanolu, který posouvá reakční rovnováhu žádoucím směrem k tvorbě MeMK. Voda může zabránit dokončení reakce, její přítomnost by proto měla být minimalizována. [15]

2.2.2.1 Transmethylace za podmínek bazické katalýzy

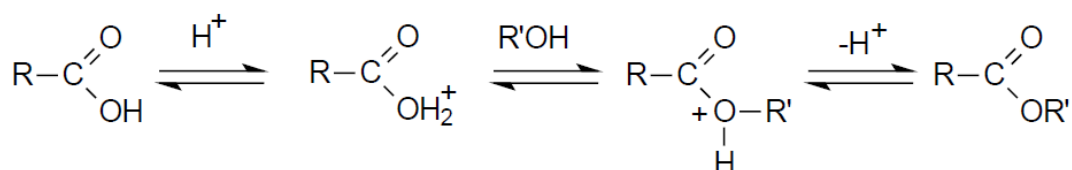
Bazické katalyzátory transesterifikují neutrální lipidy v prostředí bezvodého methanolu rychleji než kyselé katalyzátory. Nevýhodou tohoto procesu (Obrázek 8) je, že nejsou esterifikovány volné mastné kyseliny, tato metoda proto není vhodná pro vzorky s vyšším obsahem volných mastných kyselin (VMK). Nejběžněji používané chemikálie jsou hydroxid nebo methoxid sodný v bezvodém methanolu, méně často draselné varianty. [14,15]



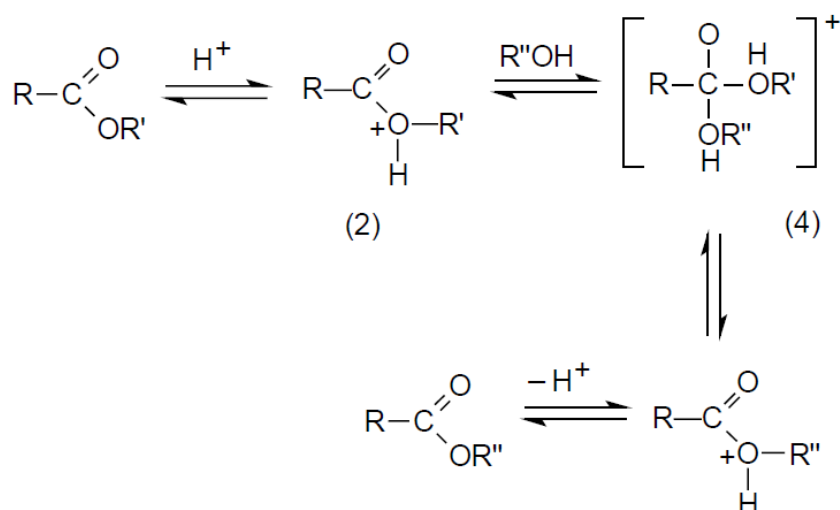
Obrázek 8: Bazicky katalyzovaná transesterifikace [14]

2.2.2.2 Transmethylace za postupných bazických a kyselých podmínek

Bazický katalyzátor transmethyloje estery glycerolu na MeMK, volné mastné kyseliny jsou převedeny na soli, které pak kyselý katalyzátor přemění na methylestery mastných kyselin. Reakce se kvůli zahřívání, které ji urychluje, provádí v baňce pod zpětným chladičem. Metoda je tak vhodná i pro vzorky s vysokým obsahem VMK, protože dochází k (trans)methylaci veškerých mastných kyselin (Obrázek 9 a Obrázek 10). Používají se shodné bazické katalyzátory jako v kapitole 2.2.2.1, jako kyselé katalyzátory pak bezvodý chlorovodík v methanolu nebo bezvodá kyselina sírová v methanolu. [15,16]



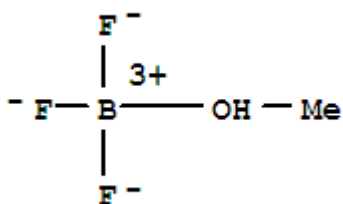
Obrázek 9: Kyselé katalyzovaná esterifikace [14]



Obrázek 10: Kyselé katalyzovaná transesterifikace [14]

2.2.2.3 Transmethylace bortriflouridem

Fluorid boritý (BF_3), jehož struktura je uvedena na Obrázku 11, je silná Lewisova kyselina a ve formě koordinačního komplexu s methanolem (za záhřevu pod zpětným chladičem) může rychle methylovat mastné kyseliny, stejně jako transmethylovat estery mastných kyselin (triacylglyceroly). Vzhledem ke komerční dostupnosti methanolického roztoku bortrifluoridu o vhodné koncentraci pro tuto metodu (12 – 14 %) je použití tohoto činidla velmi atraktivní, přestože má jisté nevýhody: vysokou toxicitu (práce v odtahové digestoři je nezbytná, nádobí po kontaktu s BF_3 je nutné neprodleně umýt velkým množstvím vody), relativně krátkou trvanlivost (cca 3 měsíce, lze prodloužit uchováním při nízké teplotě, např. v chladničce), potenciálně může způsobovat falešné píky na MeMK chromatogramu tvorbou derivátů MK s labilními skupinami. [15,17]



Obrázek 11: Struktura komplexu bortrifluorid-methanol [38]

2.2.3 Stanovení methylesterů mastných kyselin

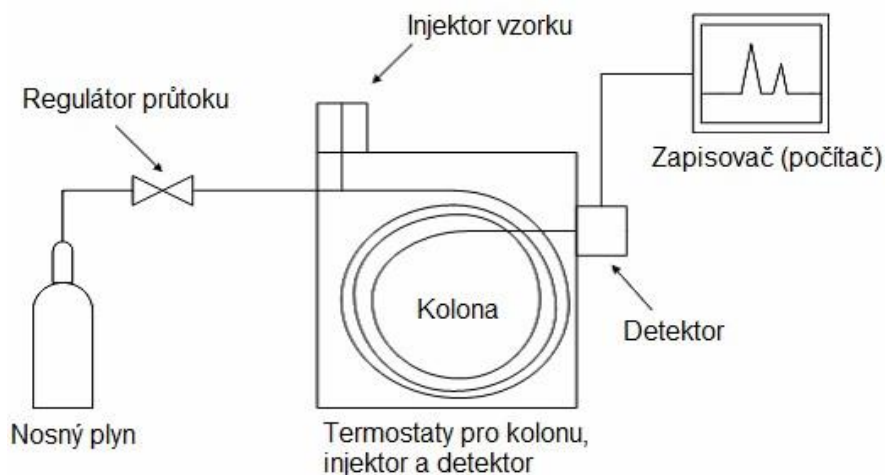
Methylestery mastných kyselin se rozdělí pomocí kapilární plynové chromatografie na vysoce polární stacionární fázi podle délky jejich řetězce a detekují se plamenově-ionizačním detektorem. [18]

2.3 Plynová chromatografie s plamenově-ionizační detekcí

Od svého zavedení na počátku 60. let 20. století se plynová chromatografie (GC) ukazuje jako efektivní, flexibilní a citlivá technika k analýze vzorků potravin. Má takřka nezastupitelné místo při analýzách těkavých látek potravin, ovlivňujících vůni a chuť, a látek ukazujících na vývoj potravin, dále při identifikaci různých organických kontaminantů a reziduí na stopové úrovni, ale také k ověřování původu a dodržování standardů kvality a bezpečnostních požadavků. Pro analýzu organických látek v potravinách vyplynulo jako nejvýhodnější způsob detekce použití plamenově-ionizačního detektoru (flame-ionization detector, FID), který se vyznačuje nejen svou univerzálností k organickým sloučeninám, ale i velmi nízkými limity detekce (až $1 \text{ pg} \cdot \text{s}^{-1}$) a širokým lineárním rozsahem (až 10^7). [19,20]

2.3.1 Popis a princip

Základní uspořádání plynové chromatografie (Obrázek 12) sestává z kolony připojené začátkem k injektorovému systému a koncem k detektoru, přičemž tato kolona je udržována při určité, programem termostatu nastavitelné, teplotě a kontinuálně smáčena nosným plynem. [21]



Obrázek 12: Schéma uspořádání kapilární plynové chromatografie [39]

Přivedením vzorku na začátek kolony dochází dynamicky u každé látky obsažené ve vzorku k rozdělení a ustavení rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází, v souladu s jejich distribučními konstantami K_C . Těkavější sloučeniny se rozdělí do větší míry vůči mobilní fázi a z kolony eluují jako první. Méně těkavé sloučeniny nebo sloučeniny se silnými interakcemi se stacionární fází eluují později. Účinnost separace je možné navýšit mj. optimalizací teplotního programu zahřívání kolony a použitím specifických selektivních stacionárních fází. [21]

Charakteristickým rysem každé sloučeniny v plynové chromatografii je její retenční čas t_R , který odpovídá době zadržení analytu s chromatografickým systémem. Složky, které nejsou v systému zadržovány vůbec, tzn. pohybují se stejnou rychlostí jako mobilní fáze, setrvávají v systému po mrtvém retenčním čase t_M (Rovnice 1). Rozdíl retenčního a mrtvého času udává redukovaný retenční čas dané složky t'_R (Rovnice 2). Analogická označení nesou i objemové charakteristiky jednotlivých analytů ukazující objemy nosného plynu nutné pro eluci dané složky (Rovnice 3). Rovnice 4 ukazuje vzájemný přepočítání mezi časy a objemy přes objemový průtok nosného plynu F_M . [22]

$$t_M = \frac{L}{u} \quad (1)$$

$$t'_R = t_R - t_M \quad (2)$$

$$V'_R = V_R - V_M \quad (3)$$

$$V_R = t_R \cdot F_M \quad (4)$$

Účinnost systému je určena délkou separačního systému L a výškou teoretického patra H a je vyjádřena počtem teoretických pater n , což ukazuje Rovnice 5, kde $t_{R,max}$ je experimentální vrchol píku a $w_{1/2}$ jeho šířka v polovině výšky. Minimální výška teoretického patra vyplývá z van Deemterovy rovnice (Rovnice 6), kde u je lineární rychlost mobilní fáze (stejně jako v Rovnici 1), A koeficient vířivé difúze, B koeficient molekulární (podélné) difúze a C_m a C_s koeficienty odporu převodu hmoty analytu mezi mobilní a mezi stacionární fází. [22]

$$n = \frac{L}{H} = 5,545 \cdot \left(\frac{t_{R,max}}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (5)$$

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_m + C_s) \cdot u \quad (6)$$

Fakt, že se počet teoretických pater nemění, pokud se nemění poměr délky kolony a jejího vnitřního průměru, vede k používání kolon s menším vnitřním průměrem, které jsou zároveň kratší, což zmenšuje mrtvý čas, a tak i celkovou dobu analýzy. [22]

2.3.2 Instrumentace

2.3.2.1 Nosný plyn

Nosný plyn je běžné označení mobilní fáze v plynové chromatografii. Nejčastěji jde o vodík a helium, méně často o dusík, argon či oxid uhličitý. Zdrojem plynů jsou tlakové lahve plněné na maximálně 20 MPa, značené nezaměnitelnými barvami (vodík červeně, dusík zeleně, helium modře s hnědým pruhem, vzduch stříbrně s hnědým pruhem atd.) s nezaměnitelným lahvovým ventilem. Čistota plynů se označuje dvoučíslím X.Z, kde X je počet devítek a Z je následné významné číslo do 100% jistoty – např. čistota 3.6 znamená 99,96% čistotu. [23]

Nečistoty tvoří hlavní problém nosných plynů, především kontaminace kyslíkem a vodní párou. Ke znečištění nosného plynu dochází zpravidla až u uživatele, např. při výměně tlakových lahví, netěsnostmi v systému nebo neodpovídající instalací plynového rozvodu. [23]

2.3.2.2 Injektor

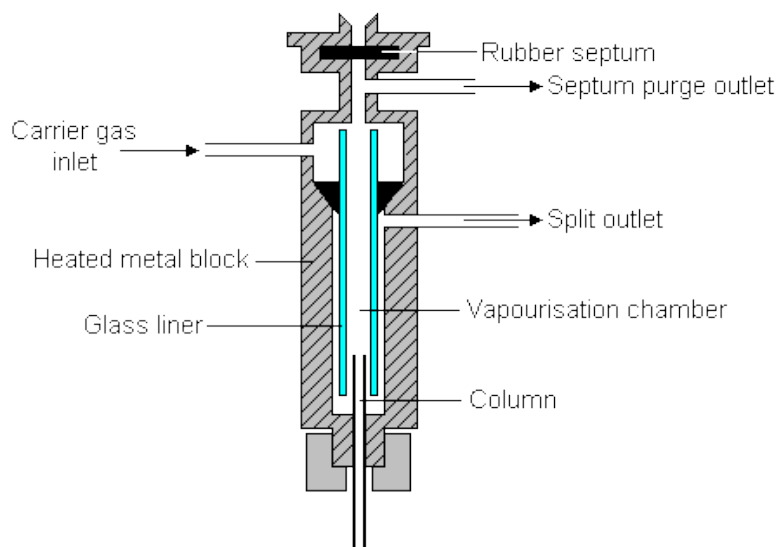
Injektáž vzorku na kolonu v plynové chromatografii zůstává stále jedním z nejkritičtějších míst úspěšné chromatografické analýzy – zásadní je rychlé a „čisté“ zplynění vzorku a jeho kvantitativní zavedení na kolonu. [24]

Součástí injektorového zařízení je několik instrumentálních součástí, které jsou nedílnou součástí celého systému.

K nabírání vzorků v kapalném skupenství (většina v GC) je nezbytná stříkačka, operující s objemy obvykle mezi 0,1 a 10,0 µl. Stříkačka dávkuje vzorek do „lineru“ v injektoru. Tato vyměnitelná, zpravidla křemenná, vnitřní část injektoru, má několik funkcí. V prvním stupni má vytvořit chemicky inaktivní prostředí pro zplyněný vzorek, neboť konstrukční část injektoru je zpravidla z nerezové oceli. Druhým úkolem této části je homogenizace vytvořeného plynného vzorku a úprava profilu proudění. Homogenizaci podporují různé tvary labyrintů nebo náplně, a to jak ve formě předkolon, tak i křemenné vaty. Tyto náplně, obzvláště s termicky degradovanými zbytky septa či částmi vzorku, vykazují velmi často chemickou aktivitu a mohou se projevit buď selektivně, ve vztahu k určitému typu látek ve vzorku jeho sorpcí (např. postupné zvyšování odezvy analytu s opakovaným měřením), nebo obecně vytvářením chvostujících píků. Výše zmíněné septum slouží jako těsnění mezi jehlou stříkačky a linerem. I přes mnohé pokusy o inovace se zatím stále ještě nepodařilo překonat jednoduchost a robustnost gumových sept – jsou levná, spolehlivá, snadno vyměnitelná. Dávkování vzorku je v dnes běžných systémech automatizováno využitím autosampleru, který nejen šetří čas

operátora (dávkování může probíhat v jeho nepřítomnosti), ale disponuje i vysokou přesností dávkovaného objemu. [22,24]

Existuje nemalý počet různých módů injekce, např. on-column, s programovanou teplotou, všeobecně nepoužívanější je však split/splitless (děličový/bezděličový) pro svou variabilitu a zároveň jednoduchost (Obrázek 13). Při split režimu injekce je otevřený děličový ventil, kterým je spolu s nosným plynem uneseno ven z injektoru kolem 99 % zplyněného vzorku, zatímco pouze asi 1 % vzorku vstupuje do kolony, naproti tomu ve splitless režimu je děličový ventil uzavřený a do kolony vstupuje 100 % nastříknutého vzorku. Je zřejmé, že split režim nachází uplatnění při analýzách koncentrovanějších vzorků, zatímco splitless při analýze velmi zředěných vzorků a při stopové analýze. [25]



Obrázek 13: Anatomie split/splitless injektoru [40]

2.3.2.3 Kolona

Plynová chromatografie užívá v zásadě dva typy kolon – náplňové a kapilární. Příchod kapilárních kolon významně snížil míru používání náplňových, přesto se náplňové kolony i dnes nadále používají v aplikacích nevyžadujících vysoké rozlišení nebo v případech, kdy je nutné zvýšit kapacitu kolony, což se dá pokládat za jednu z mála výhod náplňových kolon oproti kapilárním (příkladem úspěšné aplikace je např. separace permanentních plynů na molekulových sítích). Typické náplňové kolony bývají dlouhé 1 – 10 m a mají průměr kolem 2 – 6 mm.

Kapilární kolony vyrobené z oxidu křemičitého a potažené ochrannou vrstvou polyimidu (snižujícím křehkost a všeobecně zlepšujícím možnosti manipulace s kolonou) jsou v dnešní době nejvíce používané, vedle nich existují i méně používané kapilární kolony z nerezové oceli a z niklu, ty však nedosahují kvalit křemičitých. Kapiláry mají vnitřní průměr obvykle v rozmezí 0,1 – 0,53 mm a délku mezi 15 a 150 m.

Nejběžnějším typem kapilární kolony je WCOT (wall-coated open tubular) – kolona s vnitřní stěnou potaženou tenkým filmem kapalné stacionární fáze (0,1 – 0,5 μm), např. nepolárním polydimethylsiloxanem nebo polárním polyethylenglykolem (PEG, Carbowax, DB WAX), kterou lze snadno modifikovat a tím upravovat selektivitu kolony.

Kolony typu WCOT disponují vynikajícím rozlišením, na jeden metr délky připadá i 5 000 teoretických pater, běžná 50m kolona tak má až 250 000 teoretických pater.

Kapilární kolona typu SCOT (support-coated open tubular) má určitou podobnost s náplňovými kolonami v tom, že je naplněna mikročásticemi vázanými k stacionární fázi na vnitřní stěně kapiláry, jejíž vnitřní průměr je tak asi pětikrát větší než u WCOT. Typ PLOT (porous layer open tubular) zahrnuje kolony používané pro adsorpční plynovou chromatografii. Kapilára je u tohoto typu naplněna částicemi aluminy nebo molekulovým sítem, typickou aplikací je dělení permanentních plynů.

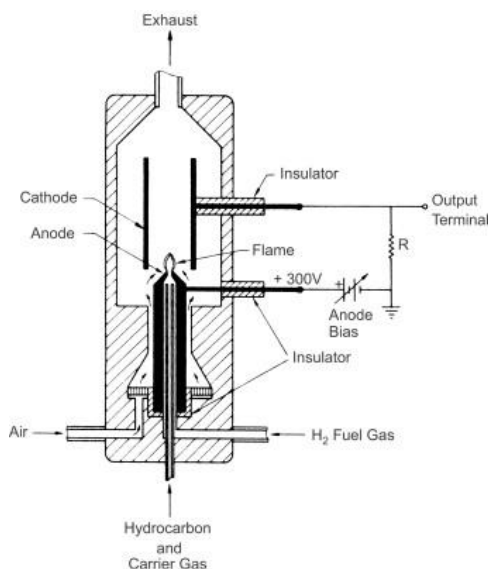
Hlavní nevýhodou kapilárních kolon je nebezpečí jejich přetížení, resp. překročení jejich kapacity, která se pohybuje v rozmezí od 100 ng vzorku u kolony s vnitřním průměrem 0,25 mm s 0,25 μm filmem až po 5 μg vzorku u kolony 0,53 mm \times 5 μm . [26]

2.3.2.4 Plamenově-ionizační detektor

Plamenově-ionizační detektor je destruktivní hmotnostně citlivý detektor (Obrázek 14). Jeho odezva je přímo úměrná hmotnosti uhlíku prošlého detektorem za jednotku času, resp. detektor poskytuje lineární odezvu na jím procházející množství uhlíku nezávisle na struktuře sloučeniny.

Vodíkový plamen hořící teplotou kolem 2200 $^{\circ}\text{C}$ vzniká extermickou reakcí plynného vodíku se vzdušným kyslíkem za vzniku vody. Uvážením stechiometrického poměru této reakce a obsahu kyslíku v přirozené atmosféře tento plamen teoreticky vyžaduje 2,5-krát větší průtok vzduchu oproti průtoku vodíku, v praxi je však nutný poměr průtoku vzduchu k vodíku nejméně 6:1 k dosažení co nejširšího lineárního rozsahu detekce, běžně se však na doporučení výrobců používají poměry 10:1 i vyšší.

Organické sloučeniny ve vzorku přivedené k počáteční části plamene jsou v proudu vodíku redukovány na své nasycené deriváty, během jejich postupování plamenem dál jsou štěpeny vazby mezi uhlíky a pokračuje reakce s vodíkem. Toto dává vzniknout methanu, který je dál v plameni spalován za vzniku kationu CHO^+ , který je primárním signál poskytujícím iontem. Všechny pozitivně nabitě ionty jsou shromažďovány negativně nabitým kolektorem (-200 V), za tvorby el. proudu, který je následně elektronicky zesílen a digitalizován. [27,28]



Obrázek 14: Anatomie plamenově-ionizačního detektoru [41]

2.4 Validace analytických metod

Validace metody se dá definovat jako proces s cílem prokázání kvality analytické metody za definovaných podmínek. Ověření metody sestává ze stanovování parametrů metody, jako jsou výtěžnost, opakovatelnost, reprodukovatelnost, mez detekce, mez stanovitelnosti, pracovní rozsah, linearita, nejistota a robustnost. [29]

2.4.1 Výtěžnost

Výtěžnost (Recovery) je podíl látky získané z celkového množství látky (získatelného) za specifikovaných podmínek metody (Rovnice 7). [30]

$$R = \frac{q_a}{q} \cdot 100 \% \quad (7)$$

R	výtěžnost stanovení analytu [%]
q_a	analýzou stanovené množství analytu
q	přidané / skutečné množství analytu

2.4.2 Opakovatelnost

Opakovatelnost (Repeatability) vyjadřuje preciznost měření za podmínek opakovatelnosti, tzn. tatáž zkušební metoda, tentýž zkoušený materiál, tatáž laboratoř, tentýž pracovník a tytéž přístroje a zařízení a krátký časový interval provedení analýzy. [30,31]

2.4.3 Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost (Reproducibility) vyjadřuje preciznost měření za podmínek reprodukovatelnosti, tzn. provedení měření toutéž metodou jinými laboratořemi, různými pracovníky, na různých přístrojích a zařízeních po dostatečně dlouhém čase ve srovnání s délkou trvání jednotlivého měření. [30,31]

2.4.4 Mez detekce

Mez detekce odpovídá nejnižšímu množství stanovované látky ve vzorku, které může být detekováno, ale nemusí být nutně kvantifikováno. V separačních technikách se uvádí mez detekce jako trojnásobná hodnota šumu základní linie (Rovnice 8), což ukazuje na statisticky významný analytický signál. [30,31]

$$LOD = 3 \cdot \frac{h_0}{a} \quad (8)$$

LOD	mez detekce analytu
h_0	šum na základní linii
a	směrnice kalibrační přímky

2.4.5 Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být kvantitativně stanoveno s přijatelnou přesností. V separačních technikách se uvádí jako desetinásobek šumu základní linie (Rovnice 9), což odpovídá koncentraci, u níž přesnost stanovení dovoluje kvantitativní vyhodnocení. [30,31]

$$LOQ = 10 \cdot \frac{h_0}{a} \quad (9)$$

LOQ	mez stanovitelnosti analytu
h_0	šum na základní linii
a	směrnice kalibrační přímky

2.4.6 Pracovní rozsah

Pracovní rozsah metody je koncentrační rozsah, ve kterém lze dosáhnout přijatelné správnosti a přesnosti stanovení. Pracovní rozsah je rozsáhlejší než lineární rozsah metody. [29]

2.4.7 Linearita

Linearita se definuje jako přímková závislost mezi analytickým signálem a koncentrací analytu. Jde tedy o schopnost metody poskytnout signál přímo úměrný koncentraci analyzované látky ve vzorku, tj. tzv. lineární regresní závislost (Rovnice 10). [29]

$$y = ax + b \quad (10)$$

y	analytický signál
x	koncentrace analytu
a	regresní koeficient (směrnice přímky)
b	úsek posunutí

2.4.8 Nejistota

Nejistota měření označuje parametr výsledku měření a udává míru rozptylu hodnot, které by mohly být důvodně prisuzovány k měřené veličině. Jde tedy o jisté vymezení hranic správnosti výsledku, tedy je-li výsledek přesný a pravdivý. [30]

2.4.9 Robustnost

Je schopnost metody být netečná k mírným a často nevyhnutelným odchylkám od některé obvyklé rutinní činnosti nebo faktorů, např. teplota, vlhkost, pH apod. [29]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité laboratorní vybavení a chemikálie

3.1.1 Přístroje

- Plynový chromatograf TRACE GC, ThermoQuest Italia S. p. A., Itálie, plameno-ionizační detektor, split/splitless injektor, kapilární kolona DB WAX (30 m × 0,32 mm × 0,5 μm)
- Předvážky, EK-1200i, AND A&D INSTRUMENT LTD, Velká Británie
- Analytické digitální váhy, GR-202, AND A&D INSTRUMENT LTD, Velká Británie
- Vodní lázeň se stojany a zkumavkami
- Vakuová rotační odparka
- Topné hnízdo, Brněnská drutěva, Česká republika

3.1.2 Pracovní pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Vialky
- Nůž, nůžky
- Struhadlo, špachtle
- Parafilm, Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
- Mikropipeta, Sartorius Biohit Proline mechanická 100 – 1000 μl, Fisher Scientific, USA
- Mikropipeta, Biohit Proline mechanická 10 – 100 μl, Fisher Scientific, USA

3.1.3 Plyny

- Vodík 5.5, SAID, tlaková nádoba s redukčním ventilem
- Vzduch 5.0, SAID, tlaková nádoba s redukčním ventilem
- Dusík 5.0, SAID, tlaková nádoba s redukčním ventilem a kovovou membránou

3.1.4 Chemikálie

- Methanol p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Ethanol 96% p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Diethylether p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Petrolether p. a., Penta, Česká republika
- Isooktan Penta, Česká republika
- Hexan p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Bortrifluorid (10% methanolický roztok), pro GC, Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina chlorovodíková 35% p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Kyselina kapronová p. s., Merck, Německo
- Kyselina kaprinová p. s., Merck, Německo
- Kyselina laurová p. s., Merck, Německo
- Kyselina myristová p., Fluka, Německo
- Kyselina palmitová p. s., Merck, Německo
- Kyselina stearová p. s., Merck, Německo
- Kyselina olejová p., Merck, Německo
- Kyselina linolová pro GC, Sigma-Aldrich, Německo

- Chlorid sodný p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Síran sodný bezvodý p. a., Lach-Ner, Česká republika
- Hydroxid sodný p. a., Lach-Ner, Česká republika

3.2 Analyzované vzorky

K ověření výtěžnosti byly použity vzorky řepkového oleje a sýra tylžského typu zakoupené v běžné obchodní síti.

3.3 Použité metody a postupy

3.3.1 Extrakce dle ČSN EN ISO 1735

Princip

Netukové látky výrobku se rozpustí, tuk se kvantitativně vytřepe směsí diethyletheru a petroletheru a po odpaření rozpouštědel se zváží. [16]

Chemikálie

Kyselina chlorovodíková 35 % p.a., ethanol 96 % obj. p.a., diethylether p.a., petrolether p.a.

Pomůcky a vybavení

Dělicí nálevka, zábrusová destilační baňka s kulatým dnem (50ml), vodní lázeň, pipeta dělená (5ml a 10ml), vakuová rotační odparka, analytické váhy, zkumavka, struhadlo, nůž.

Postup

Ze vzorku sýra se odstraní povrchová vrstva a vzorek se nastrouhá na struhadle. Do zkumavky se naváží 1 g nastrouhaného sýra (přesnost na desetinu mg) a přidá 5 ml kyseliny chlorovodíkové. Zkumavka se směsí se umístí do vodní lázně (80 °C) na asi 10 minut, než se sýr zcela rozpustí a směs změní barvu na tmavě fialovou, pak se zkumavka vyjme a její obsah se ochladí pod studenou tekoucí vodou.

Ochlazená směs se 5 ml ethanolu převede kvantitativně do dělicí nálevky, do níž se dále přidá 9 ml diethyletheru a 9 ml petroletheru, přičemž po každém přidavku se směs promíchá a třepe po 1 min. Směs se nechá odstát nejméně 30 min při laboratorní teplotě, než dojde k jasnému oddělení fází (horní fáze je čirá, Obrázek 15). Do zcela suché a předem zvážené destilační baňky se pipetou opatrně odebere svrchní fáze. Tento extrakční krok se provede ještě dvakrát za použití polovičního množství rozpouštědel, tj. 4,5 ml diethyletheru a 4,5 ml petroletheru, extrakty se postupně přidávají přímo do baňky. Rozpouštědlo se následně nechá odpařit na vakuové rotační odparce při teplotě do 40 °C.

Vyextrahovaný tuk se zváží na analytických vahách se přesností na 0,1 mg (gravimetrické stanovení obsahu tuku, Rovnice 11). [16]

$$w_{\text{tuk}} = \frac{m_{\text{tuk}} \cdot 100 \%}{m_{\text{vz}}} \quad (11)$$



Obrázek 15: Rozdělení nepochární a polární fáze

3.3.2 Příprava standardu mastných kyselin

Do 10ml odměrné baňky se kvantitativně přenesou po 0,6 ml kapalných kyselin, resp. 0,6 g pevných kyselin (přesné navážky se zaznamenají). Baňka obsahující všechny potřebné kyseliny se doplní izooktanem po rysku. (Případné nerozpuštěné mastné kyseliny se před doplněním baňky izooktanem rozpustí zahřátím odměrné baňky v horké vodní lázni. Baňka se doplní rozpouštědlem až po zchlazení na laboratorní teplotu.)

3.3.3 Příprava methanolického roztoku hydroxidu sodného

Ve 100 ml methanolu se rozpustí 2 g hydroxidu sodného za mírného zahřívání ve vodní lázni.

3.3.4 Příprava methylesterů mastných kyselin

Princip

Prvním krokem – bazickou katalýzou – jsou triacylglyceroly transmethylovány methanolickým roztokem hydroxidu sodného na methylestery mastných kyselin, volné mastné kyseliny jsou převedeny na své soli. Druhým krokem – kyselinou katalýzou – jsou soli mastných kyselin převedeny na methylestery reakcí s komplexem bortrifluorid-methanol. [15]

Chemikálie

Bezvodý roztok hydroxidu sodného v methanolu ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), bezvodý roztok bortrifluoridu v methanolu (10 %), isooktan p.a., chlorid sodný p.a. (nasyc. aq), bezvodý síran sodný p.a.

Pomůcky a vybavení

Zábrusová destilační baňka s kulatým dnem (50ml), dutá zátka se zábrusem, zpětný chladič se zábrusem, topné hnízdo, mikropipeta, špičky, pipety dělené (5ml), pipetovací balonek, odměrný válec (50ml), vialky (2ml a 4ml); sestavená aparatura je na Obrázku 16.



Obrázek 16: Aparatura pro esterifikaci

Postup

Do 50ml destilační baňky s kulatým dnem se přenese 0,1 g vzorku tuku (0,1 ml oleje), 4 ml $0,5\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ methanolického roztoku hydroxidu sodného a vloží se varný kamínek. Nad baňkou se sestaví se destilační aparatura se zpětným chladičem a topným hnízdem.

Obsah baňky se nechá vařit, než vymizí tukové kapénky (5–10 minut), případný kroužek hydroxidu na stěně baňky se rozpustí opatrným zakroužením baňkou.

Do vroucí směsi se pak chladičem přidá 5 ml methanolického roztoku fluoridu boritého a pokračuje se ve varu, obsah baňky by se měl vřít celkově 30 minut. Pak se chladičem přidají 3 ml izooktanu, baňka s chladičem se zvednou od topného hnízda a počká se, než var ustane.

Baňka se oddělí od chladiče a k jejímu obsahu se přidá 20 ml nasyceného vodného roztoku chloridu sodného, baňka se uzavře zátkou a obsah se třepe 15 sekund. Pak se přidá tolik nasyceného roztoku chloridu sodného, aby hladina tekutiny v baňce dosáhla k hrdlu baňky a bylo možné dobře rozeznat mezifázové rozhraní. Potom se baňka nechá asi 5 minut odstát.

Z horní vrstvy se odeberou 2 ml do 4ml vialky, přidá se troška bezvodého síranu sodného a obsah vialky se promíchá. Z roztoku se odebere 1 ml do 2ml vialky k analýze na plynovém chromatografu. [15]

3.3.5 Podmínky stanovení methylesterů mastných kyselin

- Plynový chromatograf, TRACE GC, ThermoQuest Italia S. p. A., Itálie
- Autosampler AI/AS 3000
- Kapilární kolona DB WAX (30 m \times 0,32 mm \times 0,5 μm)

- Oven – teplotní program
 - 50 °C 1 min
 - Vzestupný gradient 25 °C·min⁻¹ do 200 °C se zdržením 0 min
 - Vzestupný gradient 3 °C·min⁻¹ do 230 °C se zdržením 30 min
 - Celková doba analýzy: 47 min
- Inlet
 - Teplota injektoru: 250 °C
 - Splitless time: 1 min
 - Dávkování: 1 µl, splitless autosampler
- Nosný plyn
 - Průtok dusíku: 1 ml·min⁻¹
- Plamenově-ionizační detektor (FID)
 - Teplota detektoru: 250 °C
 - Průtok vzduchu: 350 ml·min⁻¹
 - Průtok vodíku: 35 ml·min⁻¹
 - Make-up dusíku: 30 ml·min⁻¹

3.3.6 Výpočet obsahu mastných kyselin ve vzorku

Koncentrace mastných kyselin ve vzorku se vypočítá srovnáním naměřené plochy píku MeMK s plochou píku MeMK známé koncentrace (standardu) dle Rovnice 12, přepočtem koncentrace MeMK na koncentraci MK pomocí relativních molekulových hmotností (Rovnice 13), korekcí na použitý objem isooktanu (Rovnice 14) a vztažením na navážku vzorku (Rovnice 15). Potřebné parametry standardů jsou uvedeny v Tabulce 2.

$$c_{\text{MeMK}} = \frac{P_{\text{MeMK}}}{P_{\text{st}}} \cdot c_{\text{st}} \quad (12)$$

$$c_{\text{MK}} = \frac{M_{\text{r,MK}}}{M_{\text{r,MeMK}}} \cdot c_{\text{MeMK}} \quad (13)$$

$$m_{\text{MK}} = c_{\text{MK}} \cdot V_{\text{i-okt}} \quad (14)$$

$$c_{\text{vz}} = \frac{m_{\text{MK}}}{m_{\text{vz}}} \quad (15)$$

c_{MeMK}	koncentrace MeMK v extraktu [mg·ml ⁻¹]
c_{st}	koncentrace standardu [mg·ml ⁻¹]
P_{MeMK}	plocha píku MeMK extraktu [mV·s]
P_{st}	plocha píku standardu [mV·s]
c_{MK}	koncentrace MK v extraktu [mg·ml ⁻¹]
$M_{\text{r,MK}}$	molární hmotnost MK [g·mol ⁻¹]
$M_{\text{r,MeMK}}$	molární hmotnost MeMK [g·mol ⁻¹]
m_{MK}	hmotnost MK v baňce [mg]
$V_{\text{i-okt}}$	objem isooktanu (3 ml)
c_{vz}	koncentrace MK ve vzorku [mg·g ⁻¹]
m_{vz}	navážka vzorku [g]

Tabulka 2: Přehled parametrů mastných kyselin

	MeMK	Retenční čas [min]	Koncentrace [mg·ml ⁻¹]	plocha píku [mV·s]	M _{r,MeMK} [g·mol ⁻¹]	M _{r,MK} [g·mol ⁻¹]
C6:0	kapronová	5,74	0,04	2767172	130,187	116,160
C8:0	kaprylová	6,87	0,04	3310175	158,241	144,214
C10:0	kaprinová	8,01	0,04	3760655	186,295	172,268
C11:0	undekanová	8,64	0,02	1968818	200,322	186,295
C12:0	laurová	9,37	0,04	4302041	214,349	200,322
C13:0	tridekanová	10,2	0,02	2181950	228,376	214,349
C14:0	myristová	11,19	0,04	4575751	242,403	228,376
C14:1	myristolejová	11,67	0,02	2214617	240,387	226,360
C15:0	pentadekanová	12,35	0,02	2288453	256,430	242,403
C15:1	pentadecenová	12,92	0,02	2262521	254,414	240,387
C16:0	palmitová	13,72	0,06	7158423	270,457	256,430
C16:1	palmitolejová	14,19	0,02	2322445	268,441	254,414
C17:0	heptadekanová	15,25	0,02	1589265	284,484	270,457
C17:1	heptadecenová	15,79	0,02	2356498	282,468	268,441
C18:0	stearová	16,99	0,04	4825867	298,511	284,484
C18:1	olejová	17,47	0,04	7231723	296,495	282,468
C18:2	linolová	18,46	0,02	4293902	294,479	280,452
C18:3n6	gama-linolenová	19,21	0,02	2200645	292,463	278,436
C18:3n3	linolenová	20,02	0,02	2177651	292,463	278,436
C20:0	arachová	21,56	0,04	4870180	326,565	312,538
C20:1	eicosenová	22,3	0,02	2405373	322,533	308,506
C20:2	eicosadienová	23,93	0,02	2275580	322,533	308,506
C21:0	heneicosanová	24,8	0,02	2396746	340,592	326,565
C20:3n6	eicosatrienová 6	25,02	0,02	2033416	320,517	306,490
C20:3n3	eicosatrienová 3	25,99	0,02	2092644	316,485	302,458
C20:4	arachidonová	26,47	0,02	1697510	318,501	304,474
C20:5aC22:0	behenová	28,96	0,04	6480041	354,619	340,592
C22:1	eruková	30,16	0,02	2374777	352,603	338,576
C22:2	docosadienová	32,9	0,02	2031932	350,587	336,560
C23:0	trikosanová	34,29	0,02	2228815	368,646	354,619
C24:0	lignocerová	41,21	0,04	4166992	382,673	368,646
C24:1	nervonová	43,29	0,02	1937341	380,657	366,630
C22:6	docosahexaenová	43,79	0,02	1553663	342,523	328,496

3.3.7 Statistické zpracování výsledků

Data byla zpracována a vyhodnocena pomocí programu MS Excel 2016.

Každé měření bylo provedeno dvakrát (n=2), v rámci statistického zpracování hodnot byly použity ukazatele aritmetický průměr a relativní směrodatná odchylka (RSD).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato bakalářská práce je součástí projektu řešeného na našem ústavu, který se zabývá stanovením mastných kyselin v různých potravinových matricích.

Práce navazuje na předchozí závěrečné práce [6, 42, 43], kde byla optimalizována a validována metoda využívající GC-FID; jejím cílem bylo ověřit výtěžnost této metody. Metoda byla nejprve testována na směsi standardů MK, následně na vzorcích rostlinného oleje a přírodního sýra, nicméně bude aplikovatelná na různé typy biologických matric.

Samotné stanovení MK sestává z několika dílčích kroků:

- extrakce lipidické frakce ze vzorku potravin,
- (trans)esterifikace, tj. převedení mastných kyselin tuku na methylestery,
- stanovení methylesterů mastných kyselin pomocí GC-FID.

4.1 Extrakce lipidů

Extrakce lipidického podílu je nezbytnou součástí analýzy u vzorků, které obsahují nezanedbatelný podíl jiných přírodních látek, např. proteinů, sacharidů. Extrakční krok je tedy nutné provést při analýze mléčných výrobků, smetany, jogurtu, přírodních sýrů aj. Naopak rostlinné oleje obsahují prakticky jen tuk, u jejich analýzy je tak možné tento krok vynechat.

Extrakce tuku z matrice potravinového vzorku patří mezi místa analýzy, u nichž lze očekávat jistou ztrátovost, už jen z podstaty tohoto procesu i vzhledem k jeho manuálnímu provádění, je proto zapotřebí postupovat zde s vysokou přesností a čistotou a všechny dílčí kroky extrakce by měly být provedeny co možná nekvantitativněji.

Srovnáním metod extrakce se zabývala práce Pruknerové [6], kde bylo mj. provedeno srovnání extrakce dle ČSN EN ISO 1735 a devíti různých modifikací extrakce podle Folche. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u normovaného postupu. Extrakce dle ČSN sice trvá cca 150 minut, ale zkoušené úpravy extrakce podle Folche byly buď časově méně náročnější (např. 80 minut) a poskytovaly nízké výtěžky, nebo k jejich provedení bylo potřeba ještě více času než pro normovanou metodu (180 minut a více), kterou ve výtěžnosti nepřekonal. Je také potřeba poukázat na rozdílnou manuální náročnost metod, stejně jako na používání toxických rozpouštědel (methanol) v metodě podle Folche.

Validací metod se ve své práci zabýval Koval [42], kde byla potvrzena vyšší výtěžnost ČSN metody, opakovatelnost a reprodukovatelnost metod byly srovnatelné.

V této práci byla z výše uvedených důvodů provedena extrakce dle ČSN EN ISO 1735 na vzorku sýra tylžského typu.

4.2 Esterifikace mastných kyselin

Převedení mastných kyselin z matrice, kde se nachází ve volné nebo vázané formě v triacylglycerolech, na jejich methylestery je velmi vhodnou součástí analýzy jakýchkoli vzorků (existují sice metody přímého stanovení mastných kyselin, jejich výsledky však nedosahují kvalit analýz při provedení derivatizace). Methylestery se vyznačují vysokou těkavostí, teploty varu jednotlivých MeMK se od sebe liší v dostatečné míře, aby mohly být následně děleny plynovou chromatografií.

V předchozích citovaných pracích projektu [6, 43] byly porovnávány různé metody esterifikace vycházející z normy ČSN EN ISO 12966-2 [15], tj. bazická esterifikace, postupná bazická a kyselá esterifikace a kyselá esterifikace s použitím BF₃; tyto metody jsou popsány

v teoretické části této práce v kapitole 2.2.2. Jako nejlepší se ukázalo použití metody transesterifikace s BF_3 . I přes vysokou toxicitu fluoridu boritého a s ní spjatou nutností velmi opatrné a přesnou práce, se ukazuje tato metoda jako nejvýhodnější, např. díky její nižší manuální náročnosti a rychlejšímu provedení.

V práci Kovala [42] byla provedena optimalizace délky doby varu, která se ukázala být dalším faktorem ovlivňujícím celkovou výtěžnost analýzy. Z práce vyplynulo, že var po dobu 20 minut není dostatečně dlouhý, zatímco při varu delším než 40 minut dochází k pozvolné degradaci MeMK. Optimální doba esterifikace je dle práce 30 minut, tato doba tak byla dodržena při řešení této práce, při níž byly esterifikaci podrobeny vzorky řepkového oleje, standard MK, jejich směs a extrakt tuku sýra.

4.3 Stanovení methylesterů mastných kyselin

Stanovení MeMK probíhalo na plynovém chromatografu s plamenově-ionizačním detektorem. Metoda byla zavedena prací Pruknerové [6], optimalizace byla provedena v práci Kovala [42]. Tato optimalizace zkrátila dobu analýzy na GC-FID z 62 minut na 47 minut výměnou kapilární kolony, zvýšením průtoku nosného plynu a optimalizací teplotního programu. V této práci jsou dodrženy stejné podmínky pro GC-FID, jako byly navrženy v Kovalově práci (viz 3.3.5).

4.4 Výtěžnost stanovení

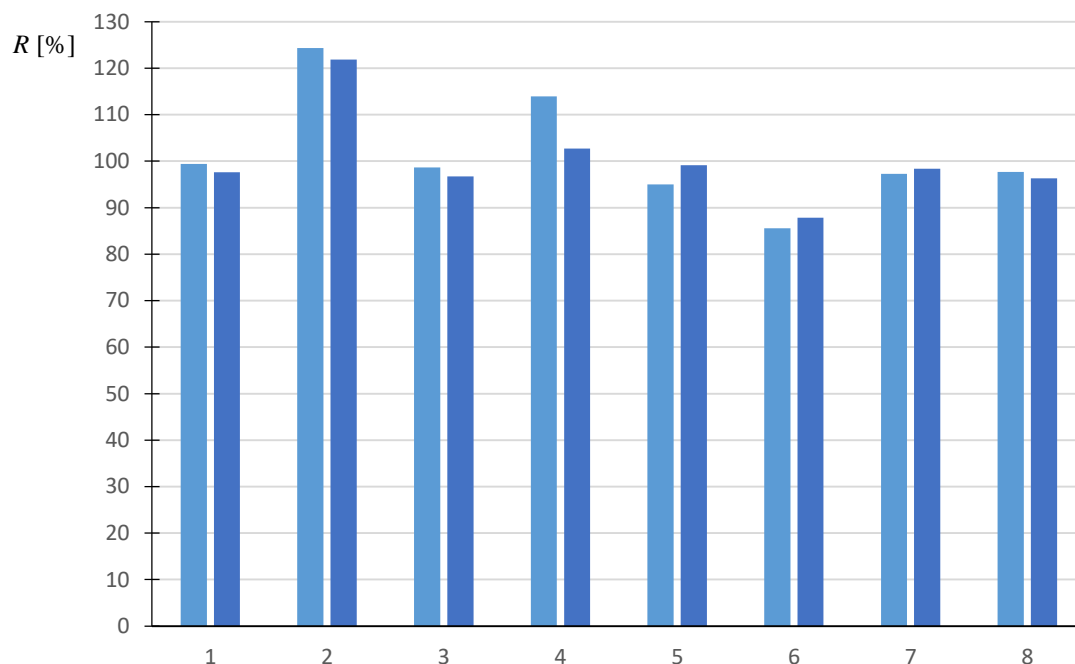
Ověření výtěžnosti bylo provedeno metodou přidavku standardu, který byl tvořen směsí osmi vybraných mastných kyselin (kapronové, kaprinové, laurové, myristové, palmitové, stearové, olejové a linolové) známé koncentrace v isooktanu. Samotný standard MK byl také analyzován (esterifikace a následně GC-FID). Dále byl analyzován extrakt tuku ze sýra; u tohoto vzorku bylo stanovení výtěžnosti provedeno jako srovnání sumy MK a údaje o obsahu tuku uvedeným výrobcem. Byla provedena vždy dvě měření téhož vzorku. Chromatogramy každého měřeného typu vzorku jsou přiloženy jako Příloha 1-4.

Vypočtené výtěžnosti měření směsi oleje se standardem jsou uvedeny v Tabulce 3, graficky pak na Obrázku 17. Pět mastných kyselin vykazuje výtěžnost mezi 95 a 100 %, což lze považovat za velmi uspokojivé výsledky, stejně jako je velmi příznivá i více než 86% výtěžnost zaznamenaná u stearové kyseliny. U kaprinové a laurové kyseliny se výtěžky pohybují nad hranicí 100 %, což lze vzhledem k jisté obtížnosti metody, zahrnující tři zmíněné kroky jako zdroje možných nepřesností, považovat sice ne za optimální, ale přijatelné.

Tabulka 3: Výtěžnosti stanovení MK ve směsi oleje a standardu MK

	MK	R_1 [%]	R_2 [%]	R [%]	RSD [%]
1	kapronová	99,43	97,6	98,52	0,92
2	kaprinová	124,36	121,87	123,12	1,25
3	laurová	98,62	96,7	97,66	0,96
4	myristová	113,93	102,72	108,33	5,61
5	palmitová	94,99	99,12	97,06	2,07
6	stearová	85,58	87,84	86,71	1,13
7	olejová	97,28	98,41	97,85	0,57
8	linolová	97,66	96,28	96,97	0,69

V Tabulkách 3 a 4 znamenají R_1 a R_2 dílčí výtěžnosti, R průměrnou výtěžnost (stejně jako v grafech na Obrázcích 17-19) a RSD relativní směrodatnou odchylku.



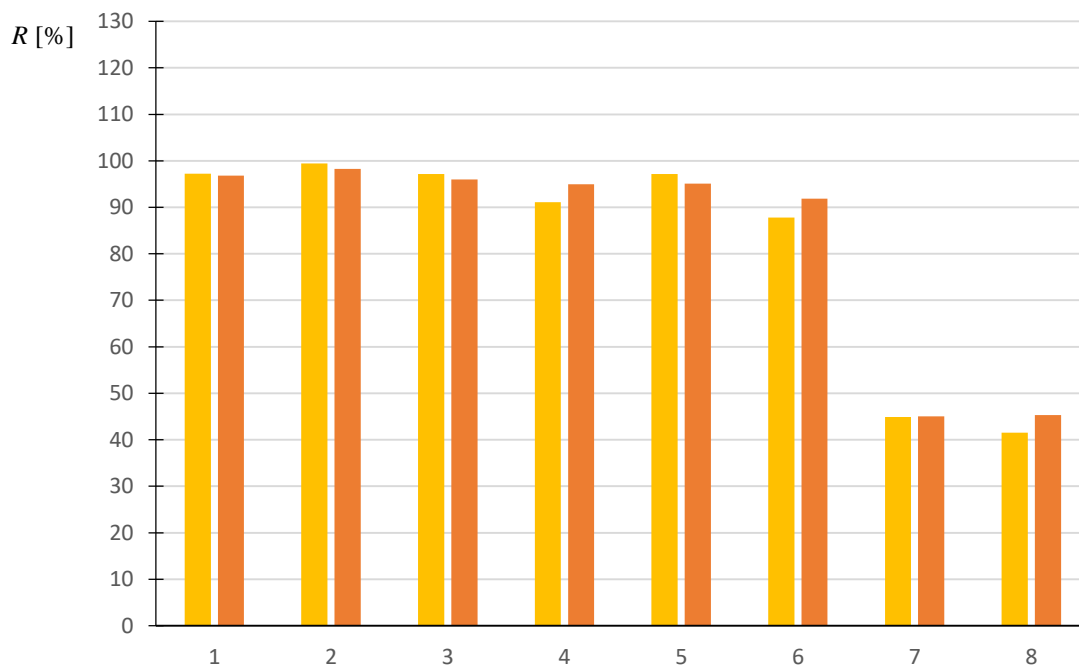
Obrázek 17: Výtěžnosti stanovení MK ve směsi oleje a standardu MK (1 – kapronová, 2 – kaprinová, 3 – laurová, 4 – myristová, 5 – palmitová, 6 – stearová, 7 – olejová, 8 – linolová)

Výtěžnosti samotného standardu MK uvádí Tabulka 4, graficky pak Obrázek 18. Získané hodnoty výtěžností jsou uspokojivé u prvních šesti MK, kde se pohybují v rozmezí 89 – 99 %. Zajímavé je, že v případě olejové a linolové kyseliny nepřesahují hodnoty výtěžnosti 50 %. Jde o MK s poměrně dlouhým retenčním časem (17,47 a 18,46 min), což způsobuje větší rozmývání píků, a poměrně malou odezvou, tj. plochou získaných píků (použitá koncentrace), což mohlo ovlivnit přesnost odečtených výsledků. To potvrzuje i fakt, že v případě směsi olej + standard MK byla dosažená výtěžnost zcela uspokojivá.

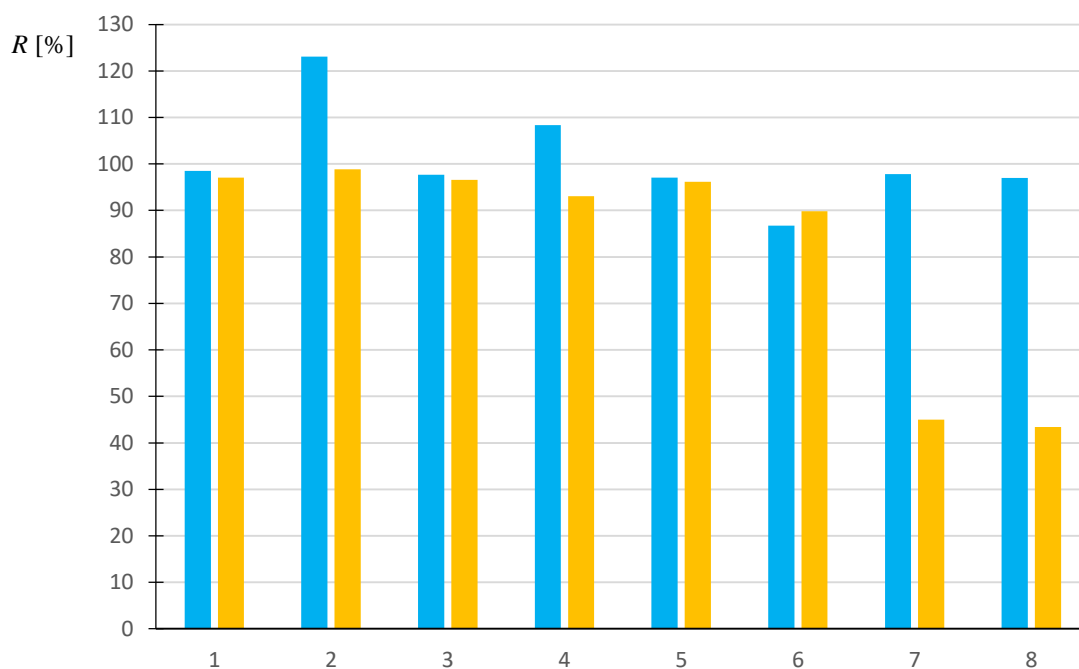
Tabulka 4: Výtěžnosti stanovení MK ve standardu MK

	MK	R_1 [%]	R_2 [%]	R [%]	RSD [%]
1	kapronová	97,23	96,82	97,03	0,21
2	kaprinová	99,44	98,24	98,84	0,60
3	laurová	97,13	96,02	96,58	0,56
4	myristová	91,11	94,95	93,03	1,92
5	palmitová	97,19	95,11	96,15	1,04
6	stearová	87,80	91,85	89,83	2,03
7	olejová	44,90	45,03	44,97	0,07
8	linolová	41,53	45,31	43,42	1,89

Graf na Obrázku 19 ukazuje vzájemné srovnání průměrných výtěžností MK ve směsi oleje se standardem MK a samotného standardu MK.



Obrázek 18: Výtěžnosti stanovení MK ve standardu MK (1 – kapronová, 2 – kaprinová, 3 – laurová, 4 – myristová, 5 – palmitová, 6 – stearová, 7 – olejová, 8 – linolová)



Obrázek 19: Srovnání výtěžností stanovení MK v oleji se standardem MK (modré) a v standardu MK (žluté) (1 – kapronová, 2 – kaprinová, 3 – laurová, 4 – myristová, 5 – palmitová, 6 – stearová, 7 – olejová, 8 – linolová)

U vzorku sýra činila výtěžnost stanovení MK (84 ± 3) %, hodnota byla vypočítána srovnáním sumy všech MK, resp. MeMK detekovaných GC-FID a hodnoty obsahu tuku deklarovanou výrobcem.

5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo ověřit výtěžnost optimalizované metody stanovení mastných kyselin pomocí plynové chromatografie. Tato práce je součástí projektu řešeného na našem ústavu, který se zabývá stanovením mastných kyselin v různých potravinových matricích, především v přírodních a tavených sýrech a rostlinných olejích. V rámci ústavu byla v několika předchozích závěrečných pracích prováděna srovnání různých dílčích metod, které jsou použitelné pro celkovou analýzu, která sestává z kroku extrakce, derivatizace a samotného stanovení na GC-FID.

Za nejlepší metodu extrakce lipidické frakce z matrice potravinového vzorku byla vybrána metoda dle normy ČSN EN ISO 1735, která mezi ostatními běžnými extrakčními metodami, které jsou vhodné pro použití k analýze vzorků výše zmíněných typů, poskytuje obecně nejvyšší výtěžky, je snadno realizovatelná díky potřebě relativně malého množství laboratorního vybavení, je bezpečná, protože nezahrnuje použití toxických rozpouštědel, a je snadno manuálně proveditelná, tyto výhody jasně převáží jistou větší časovou náročnost metody. Touto metodou byl v této práci extrahován tuk ze vzorku sýra tylžského typu.

Jako nejvýhodnější metoda derivatizace byla předchozími pracemi doporučena metoda transesterifikace s katalýzou fluoridem boritým. I přes značnou toxicitu tohoto činidla je tento způsob získání MeMK nejvhodnější, protože poskytuje nejvyšší výtěžky a je rychle a snadno proveditelná. Nezbytně nutné je však dodržet přísná bezpečnostní opatření, stejně jako řádně dodržovat postup, především dobu chemické reakce.

Stanovení MeMK bylo provedeno na plynovém chromatografu s plamenově-ionizačním detektorem. Metoda tohoto stanovení byla již dříve optimalizována vylepšením teplotního programu, výměnou kapilární kolony a zvýšením průtoku nosného plynu, stejně jako již byla ověřena její linearita, opakovatelnost a reprodukovatelnost.

Výtěžnost metody byla v této práci posuzována především metodou přidavku standardu, za který sloužil směsný roztok vybraných mastných kyselin. Jako vhodná potravinová matrice zde byl zvolen jedlý řepkový olej, který byl analyzován samostatně a posléze s přidavkem MK o známé koncentraci, tento standard MK byl podroben analýze také jako samostatný vzorek.

Zajímavý je pohled na nízké výtěžky samotných nenasyčených mastných kyselin, které jsou však při použití olejové matrice v trendu s ostatními MK.

Výsledky stanovení výtěžnosti jsou velmi uspokojivé, většina mastných kyselin vykazuje výtěžnost $(95 \pm 4) \%$, obecně je vliv matrice prakticky zanedbatelný. U vzorku sýra nebyla použita metoda přidavku standardu, ověření výtěžnosti bylo provedeno na základě srovnání zjištěného obsahu MK s údajem o obsahu tuku uváděným výrobcem, tato výtěžnost dosahovala $(84 \pm 3) \%$, což lze považovat za velmi dobrou výtěžnost vzhledem k určitým nevyhnutelným ztrátám při extrakčním kroku. Lze tedy říci, že metoda poskytuje vysoké výtěžky pro různé typy potravinových vzorků a v optimalizované formě může být používána pro praktické aplikace, např. zjišťování kvality rostlinných olejů, monitorování procesu zrání sýrů apod.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KOOLMAN, J. a K.-H. RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [2] MCMURRY, J. *Organická chemie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-7080-930-3.
- [3] COULTATE, T. P. *Food: The Chemistry of Its Components*. 3rd Ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2001. ISBN 08-540-4513-9.
- [4] MCSWEENEY, P. L. H. a M. J. SOUSA. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*. 2000, **80**(3), 293-324. DOI: 10.1051/lait:2000127. ISSN 0023-7302. Dostupné také z: <http://www.edpsciences.org/10.1051/lait:2000127>
- [5] VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [6] PRUKNEROVÁ, K. *Stanovení mastných kyselin v tavených sýrech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 80 s. Vedoucí diplomové práce: Ing. Eva Vítová Ph.D.
- [7] MCCLEMENTS, J. *Analysis of Lipids* [online]. 2003 [cit. 2019-05-19]. Dostupné z WWW: <http://people.umass.edu/~mcclemen/581Lipids.html>
- [8] HÁLKOVÁ, J., M. RUMÍŠKOVÁ a J. RIEGLOVÁ. *Analýza potravin: laboratorní cvičení*. 2. vyd. Újezd u Brna: Ivan Straka, 2001. ISBN 80-864-9403-9.
- [9] TAHA, A. Y., A. H. METHEREL a K. D. STARK. Comparative analysis of standardised and common modifications of methods for lipid extraction for the determination of fatty acids. *Food Chemistry*. 2012, **134**(1), 427-433. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.087. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612002750>
- [10] CARRASCO-PANCORBO, A., N. NAVAS-IGLESIAS a L. CUADROS-RODRÍGUEZ. From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2009, **28**(3), 263-278. DOI: 10.1016/j.trac.2008.12.005. ISSN 01659936. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993608002811>
- [11] Ambrožová, J. *Stanovení lipidů a mastných kyselin v řasách*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2011. 115 s. Vedoucí diplomové práce: Ing. Ladislava Mišurcová, Ph.D.
- [12] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [13] SHIBAMOTO, T. *Lipid chromatographic analysis*. New York: Marcel Dekker, c1994. Chromatographic science, v. 65. ISBN 08-247-8941-5.
- [14] Preparation of Ester Derivatives of Fatty Acids for Chromatographic Analysis. *AOCS Lipid Library* [online]. USA: The American Oil Chemists' Society, 2018 [cit. 2019-05-12]. Dostupné také z: <http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cmg?ItemNumber=40374>
- [15] ČSN EN ISO 12966-2 (588767): *Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin - Část 2: Příprava methylesterů mastných kyselin*. Praha: Český normalizační institut, 2015.
- [16] ČSN EN ISO 1735. *Sýry a tavené výrobky: Stanovení obsahu tuku - Gravimetrická metoda (Referenční metoda)*. Praha: Český normalizační institut, 2005.

- [17] ČSN EN ISO 12966-1 (588767): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin - Část 1: Směrnice pro moderní plynovou chromatografii methylesterů mastných kyselin. Praha: Český normalizační institut, 2015.
- [18] ČSN EN ISO 12966-4 (588767): Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin - Část 1: Metoda kapilární plynové chromatografie. Praha: Český normalizační institut, 2015.
- [19] PICÓ GARCÍA, Y. *Chemical analysis of food: techniques and applications*. Amsterdam: Elsevier, 2012. ISBN 978-0-12-384862-8.
- [20] GROB, R. L. a E. F. BARRY. *Modern practice of gas chromatography*. 4th ed. Hoboken, N. J.: Wiley-Interscience, c2004. ISBN 978-0-471-22983-4.
- [21] MCNAIR, Harold Monroe a James M. MILLER. *Basic gas chromatography*. 2nd ed. Hoboken, N. J.: John Wiley, 2009. ISBN 978-0-47-0439-548.
- [22] PĚKNICOVÁ, M. a D. KRUCINOVÁ. *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu*. Český Těšín: 2 THETA, 1999. ISBN 80-902-4329-0.
- [23] ČÁSLAVSKÝ, J. a J. G. K. ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy" : modul K02-2014*. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [24] TIPLER, A. Sample Introduction Methods. In: *Gas Chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 2012, 2012, s. 187-219. DOI: 10.1016/B978-0-12-385540-4.00008-0. ISBN 9780123855404. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123855404000080>
- [25] KENKEL, J. *Analytical chemistry for technicians*. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, c2014. ISBN 978-1-4398-8105-7.
- [26] CHRISTIAN, G. D., P. K. DASGUPTA a K. SCHUG. *Analytical chemistry*. 7th ed. Hoboken: Wiley, c2014. ISBN 978-0-470-88757-8.
- [27] KLEE, M. S. Detectors. In: *Gas Chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 2012, 2012, s. 307-347. DOI: 10.1016/B978-0-12-385540-4.00012-2. ISBN 9780123855404. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123855404000122>
- [28] HOLM, T. Aspects of the mechanism of the flame ionization detector. *Journal of Chromatography A*. 1999, **842**(1-2), 221-227. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00706-7. ISSN 00219673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967398007067>
- [29] *Zajištění kvality analytických výsledků: Sborník přednášek ze seminářů 19.-21.3.2001 a 11.-13.3.2002 v Komorní Lhotce*. Český Těšín: 2 THETA, 2002. ISBN 80-863-8011-4.
- [30] ČSN ISO 3534-1. *Statistika - Slovník a značky - Část 1: Obecné statistické termíny a termíny používané v pravděpodobnosti*. 2. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2010.
- [31] BAREK, J. a kol. Nomenklatura a terminologie: Metrologická terminologie v chemii. *Chemické listy*. 2000, 94(7), 439-444. ISSN 1213-7103.
- [32] Stearoyl-2-arachidonoyl-3-oleoyl-sn-glycerol, PubChem, dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Stearoyl-2-arachidonoyl-3-oleoyl-sn-glycerol#section=2D-Structure>
- [33] MURRAY, Robert K. *Harper's illustrated biochemistry*. 29th ed. New York: McGraw-Hill Medical, c2012. Lange medical book. ISBN 978-007-1792-776. dostupné také z: <https://awesomechem.files.wordpress.com/2016/10/harpers-illustrated-biochemistry-28th-ed-robert-k-murray-et-al-mcgraw-hill-2009.pdf>
- [34] Palmitic acid, dostupné také z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/palmitic_acid#section=2D-Structure

- [35] Oleic acid, dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oleic-acid#section=2D-Structure>
- [36] Linoleic acid, dostupné také z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linoleic-acid#section=2D-Structure>
- [37] Přístroj extrakční dle Soxhleeta s chladičem a fritovou vložkou simax, dostupné také z: <https://www.verkon.cz/pristroj-extrakcni-dle-soxhleeta-s-chladicem-a-fritovou-vlozkou-simax/?highlight=soxhlet>
- [38] Boron Trifluoride – Methanol Reagent CAS NO.373-57-9, dostupné také z: <https://hwrk.lookchem.com/products/CasNo-373-57-9-Boron-Trifluoride---Methanol-Reagent-13945968.html>
- [39] Plynová chromatografie, dostupné z: <https://docplayer.cz/4380816-06-plynova-chromatografie-gc.html>
- [40] The Split / Splitless Injector, dostupné z: <https://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrom.htm>
- [41] SCHOFIELD, K. The enigmatic mechanism of the flame ionization detector: Its overlooked implications for fossil fuel combustion modeling. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2008, **34**(3), 330-350. DOI: 10.1016/j.pecs.2007.08.001. ISSN 03601285. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360128507000469>
- [42] KOVAL, D. Výběr a optimalizace metody stanovení volných mastných kyselin. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 55 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D..
- [43] SÝKORA, M. Optimalizace a validace metody stanovení volných mastných kyselin. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 68 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D..

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

MK	mastná kyselina
VMK	volná mastná kyselina
MeMK	methylester mastné kyseliny
GC	plynová chromatografie
FID	plamenově-ionizační detektor
SPE	extrakce na tuhou fázi
MSPE	mikroextrakce na tuhou fázi
R	výtěžnost
RSD	relativní směrodatná odchylka
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
WCOT	wall-coated open tubular
SCOT	support-coated open tubular
PLOT	porous layer open tubular
p.a.	per analysis, pro analýzu
p.s.	per synthesis, pro syntézu
p.	pure, čisté
nasyc. aq	nasycený vodní roztok
acyl-CoA	acyl-koenzym A
acetyl-CoA	acetyl-koenzym A
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
QH ₂	dihydroxyubiquinol
ATP	adenosintrifosfát

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Chromatogram MeMK řepkového oleje

Příloha 2: Chromatogram MeMK standardu MK

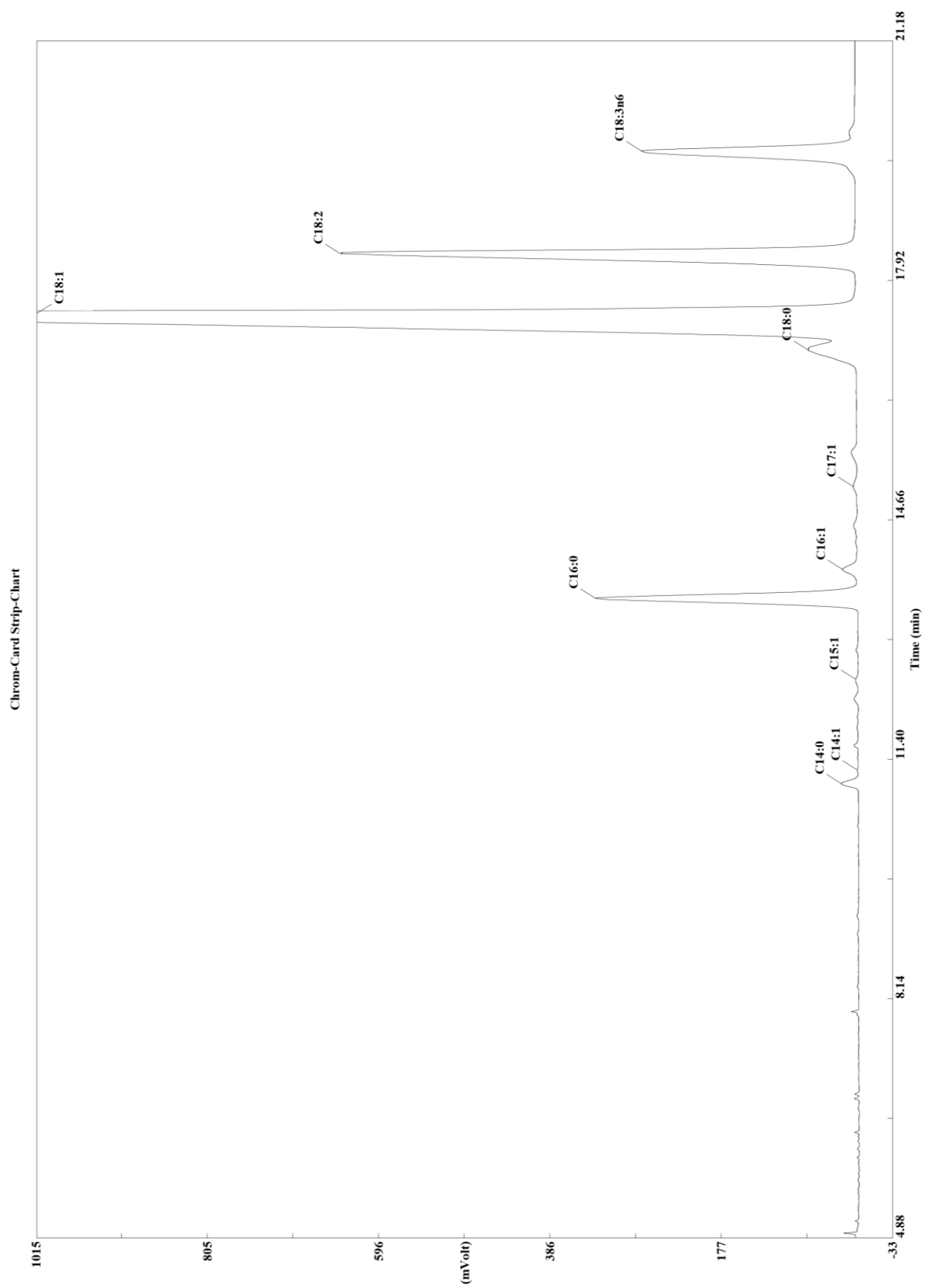
Příloha 3: Chromatogram MeMK směsi řepkového oleje a standardu MK

Příloha 4: Chromatogram MeMK sýra tylžského typu

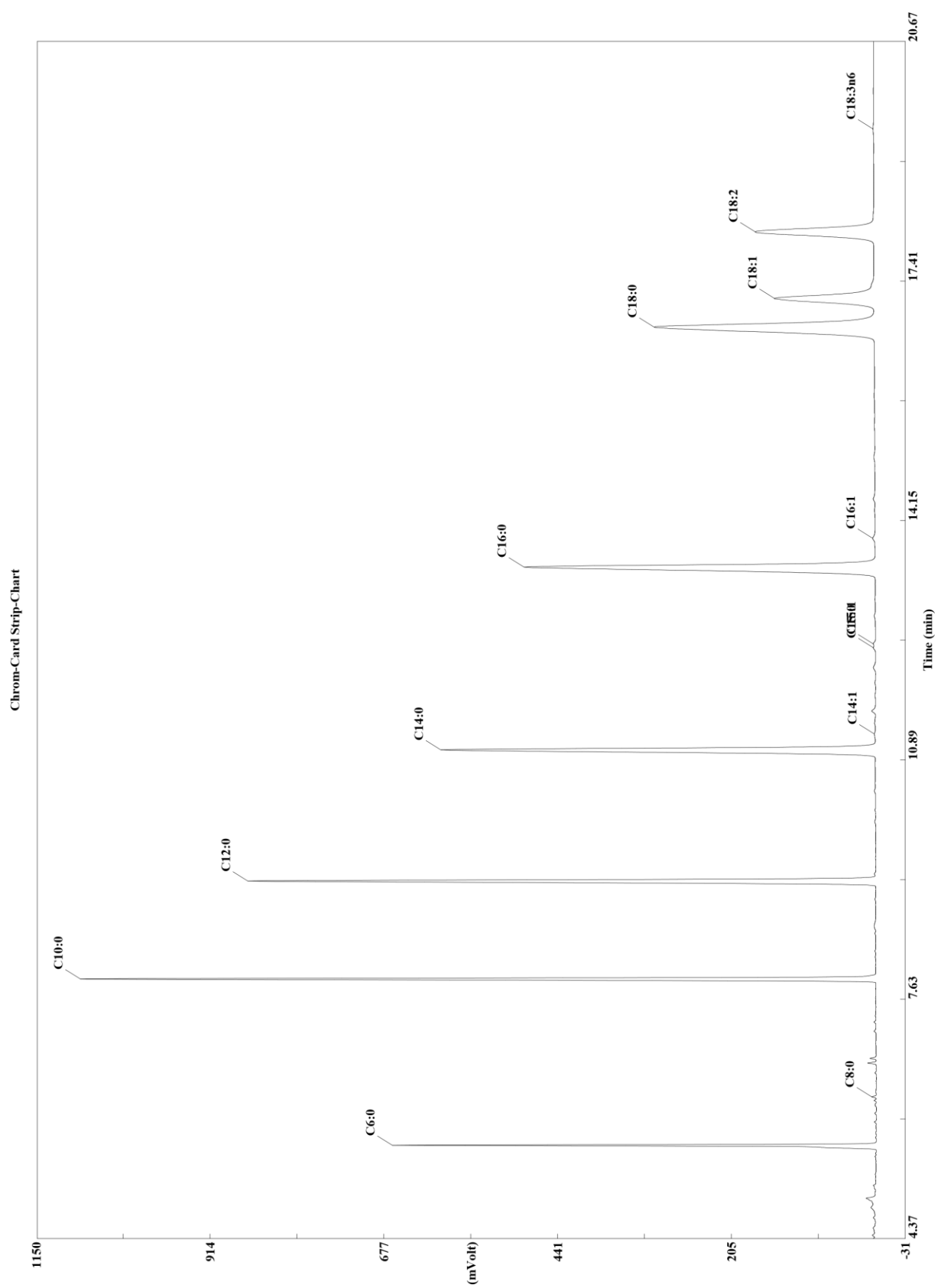
Tabulka 5: Legenda popisků píků chromatogramů

Popisek	MeMK
C6:0	kapronová
C8:0	kaprylová
C10:0	kaprinová
C12:0	laurová
C14:0	myristová
C14:1	myristolejová
C15:0	pentadekanová
C15:1	pentadecenová
C16:0	palmitová
C16:1	palmitolejová
C17:0	heptadekanová
C17:1	heptadecenová
C18:0	stearová
C18:1	olejová
C18:2	linolová
C18:3n3	linolenová
C18:3n6	γ -linolenová

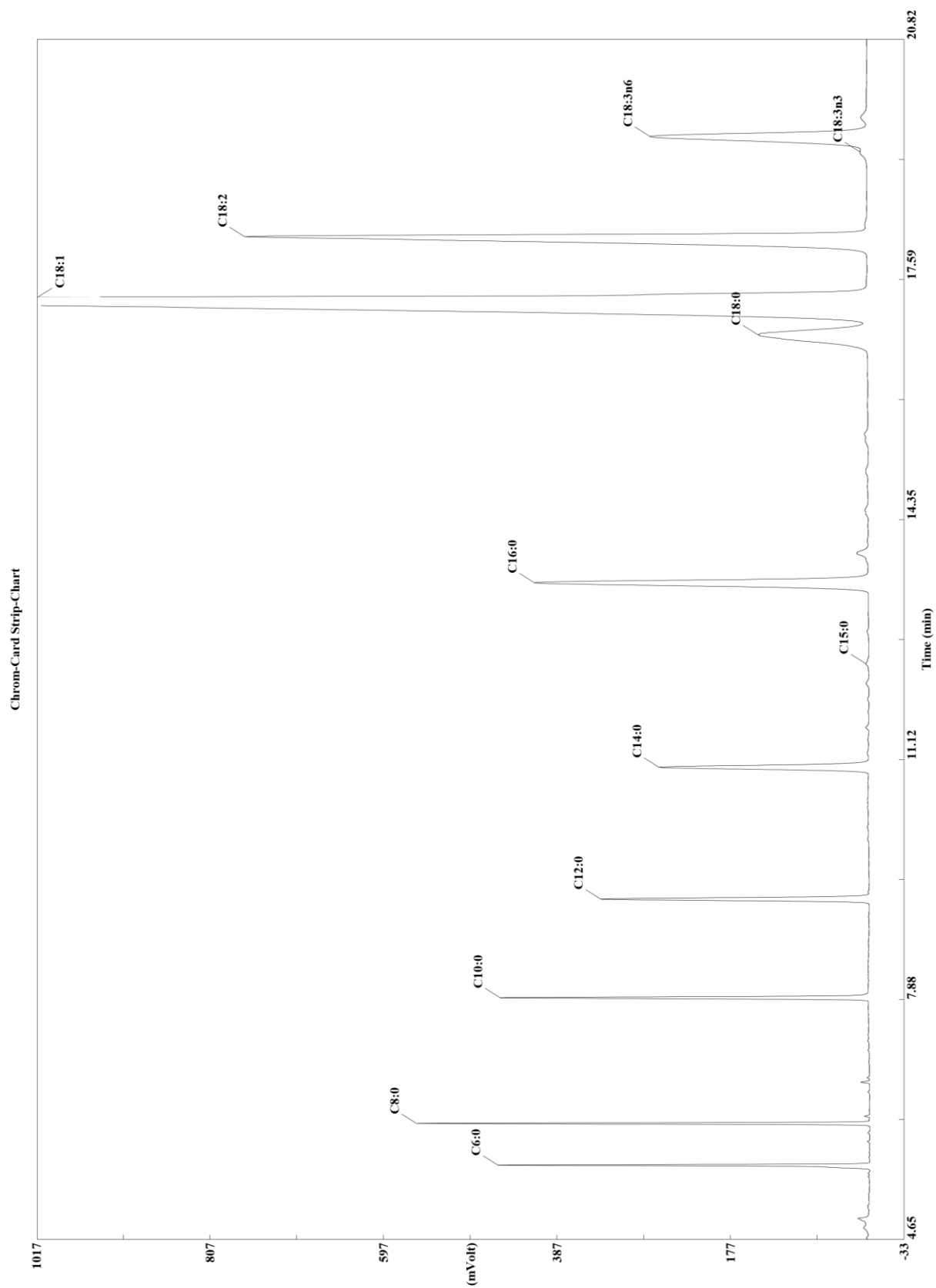
Příloha 1: Chromatogram MeMK řepkového oleje



Příloha 2: Chromatogram MeMK standardu MK



Příloha 3: Chromatogram MeMK směsi řepkového oleje a standardu MK



Příloha 4: Chromatogram MeMK syra tylžského typu

